

Struktur und Funktion enzymatisch vernetzbarer Proteaseinhibitoren von *Streptomyces mobaraensis*

Vom Fachbereich Chemie der
Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigte

DISSERTATION

eingereicht von

Dipl.-Chem. Stephan Zindel

aus Mainz

Referent: Prof. Dr. Harald Kolmar
Chemie, TU Darmstadt

Korreferent: Prof. Dr. Hans-Lothar Fuchsbauer
Chemie und Biotechnologie, Hochschule Darmstadt

Tag der Einreichung: 04. April 2013

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Mai 2013

Meiner Familie Barbara und Johannes, Patrick und Matthias Zindel

*In den Wäldern sind Dinge,
über die nachzudenken,
man jahrelang im Moos liegen könnte.*

Franz Kafka

Zusammenfassung

Streptomyceten sind immobile Bodenbakterien mit einem Pilzmyzel-ähnlichen Wachstum. Um ihren Lebensraum und sich selbst gegen Fressfeinde zu verteidigen, produzieren sie eine Vielzahl bioaktiver Sekundärmetabolite. *S. mobaraensis* produziert u.A. drei proteinöse Inhibitoren gegen Proteasen unterschiedlicher Familien, die gleichzeitig Substrate einer intrinsischen Transglutaminase (TGase) sind. Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung der codierenden Gene sowie eine weitergehende Charakterisierung der Proteine.

Das Gen des *Streptomyces*-Papaininhibitors SPI wurde über molekularbiologische Methoden vollständig identifiziert. Auch gelang die heterologe Produktion in *E. coli*, jedoch blieb *r*SPI trotz unterschiedlicher Herstellungsverfahren inaktiv. Durch spätere Experimente stellte sich heraus, dass *wt*SPI aus einem Protein mit Bindestellen für Transglutaminase und einem Kofaktor besteht, und jener Kofaktor die eigentliche inhibierende Komponente ist.

Die codierenden Gene des *Streptomyces*-Subtilisin- und TAMEP-Inhibitors SSTI sowie des Dispaseautolyse-induzierenden Proteins DAIP wurden zusammen mit den Rodlinen, Chaplinen, der TGase-aktivierenden Metalloprotease TAMEP, sowie zwei TAMEP-verwandten Metalloproteasen, fünf Klasse 1- und einer Klasse 2-Signalpeptidase über vollständige Genomsequenzierung und anschließenden Datenbankabgleich identifiziert.

Die weitere biochemische Charakterisierung von DAIP zeigte nachweislich, dass es sich hierbei um ein Enzym handeln muss, jedoch konnte der Wirkmechanismus nicht bestimmt werden. *In silico*-Analysen der Proteinstruktur wiesen auf eine Aspartylprotease hin. Die bereits früher vorgenommene Einordnung von SSTI in die Familie der Streptomyces-Subtilisininhibitoren wurde durch die vollständige Proteinsequenz bestätigt. *In silico*-Analysen der Proteinstruktur weisen darauf hin, dass die für TGase putativ zugänglichen Aminosäuren und die Subtilisinbindestelle auf gegenüber liegenden Proteinhälften liegen.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Lebenszyklus von <i>S. coelicolor</i> A3(2)	2
Abb. 2:	Tertiärstruktur der bakteriellen Transglutaminase nach Kashiwagi <i>et al.</i>	8
Abb. 3:	Primärstruktur der bakteriellen Transglutaminase von <i>S. mobaraensis</i> und der A-Kette von humanem Faktor XIII	9
Abb. 4:	Hypothetischer Katalysemechanismus der bakteriellen Transglutaminase nach Kashiwagi <i>et al.</i>	11
Abb. 5:	Primärstruktur der Transglutaminase von <i>S. mobaraensis</i> mit proteolytischen Schnittstellen	12
Abb. 6:	DNA-Größenstandard GeneRuler™ DNA Ladder-Mix	47
Abb. 7:	Schematischer Aufbau des Kapillar-Blots für die Southern Blot-Analyse	54
Abb. 8:	Faltungstrichter nach Schultz	65
Abb. 9:	Protein-Größenstandard PageRuler™ Unstained Protein Ladder	75
Abb. 10:	Schematischer Aufbau des Semi Dry-Blots für die Western Blot-Analyse	78
Abb. 11:	Protein-Größenstandard PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	79
Abb. 12:	Sequenzalignment der bekannten N-terminalen Aminosäuresequenz von SPI mit dem homologen Bereich eines Proteins von <i>S. lavendulae</i> nach Sarafeddin <i>et al.</i>	95
Abb. 13:	Für die Ableitung von Oligonukleotiden verwendete Peptide von SPI aus <i>S. mobaraensis</i> und des mutmaßlichen Proteins Q9X5U4 von <i>S. lavendulae</i>	97
Abb. 14:	Amplifikate einer PCR mit den degenerierten Primern SPI_for_SZ und SPI_rev_SZ sowie genomischer DNA von <i>S. mobaraensis</i> bei zwei verschiedenen Prähybridisierungstemperaturen	97
Abb. 15:	Nukleotidsequenz und Sequenzalignment eines sequenzierten 0.22 kb-PCR-Amplifikats produziert mit DNA von <i>S. mobaraensis</i>	98
Abb. 16:	Agarosegel und Southern Blot zum Nachweis des <i>spi</i> -Gens in fragmentierter genomischer DNA von <i>S. mobaraensis</i>	100
Abb. 17:	Kolonie-PCR mit <i>E. coli</i> -Flüssigkulturen zur Identifizierung von Transformanten mit SPI-codierendem Gen	101
Abb. 18:	Kolonie-PCR mit <i>E. coli</i> -Flüssigkulturen der Mikrotiterplatten 1 und 6 für den Nachweis SPI-codierender Transformanten	102
Abb. 19:	Kolonie-PCR mit <i>E. coli</i> -Flüssigkulturen der Mikrotiterplatten 1-H und 6-D zur Identifizierung SPI-codierender Transformanten	103
Abb. 20:	SPI-codierende Nukleotid- und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz der Klone 1 _H 7 und 6 _D 7	104
Abb. 21:	Aus SPI-codierender DNA abgeleitete Aminosäuresequenzen von <i>S. mobaraensis</i> im Vergleich mit dem mutmaßlichen Protein Q9X5U4 von <i>S. lavendulae</i>	104
Abb. 22:	Primärstruktur des SPI	106
Abb. 23:	Schematische Darstellung des <i>Streptomyces</i> -Papaininhibitors	107
Abb. 24:	Western Blot-Analyse der rekombinanten Produktion von SPI-His ₆ in <i>E. coli</i> Shuffle® mit Anti-His ₆ -IgG	111
Abb. 25:	Restaktivität von Papain in Gegenwart von rSPI-His ₆ mit reduziertem Glutathion in der Kulturbrühe	113
Abb. 26:	Restaktivität von Papain in Gegenwart von thiolaktiviertem rSPI	114

Abb. 27: Restaktivität von Papain in Gegenwart von glutathionaktiviertem rSPI	115
Abb. 28: Restaktivität von Papain in Gegenwart von aus Einschlusskörpern rückgefaltetem rSPI	117
Abb. 29: Proteinmuster von aus EK rückgefaltetem rSPI	118
Abb. 30: Restaktivität von Papain in Gegenwart von aus EK rückgefaltetem rSPI nach DNaseI-/Lysozymverdau, NaCl-Zusatz und Ultraschallinkubation	119
Abb. 31: Restaktivität von Papain in Gegenwart von aus EK bei variablen Temperaturen rückgefaltetem rSPI	120
Abb. 32: SDS-PAGE und Western Blot der Produktion, EK-Präparation und Rückfaltung von rSPI-His ₆	122
Abb. 33: Kationenaustauschchromatogramm und inhibitorische Aktivität von rSPI-Stopp im großen Ansatz	123
Abb. 34: Restaktivität von Papain in Gegenwart von wtSPI vor und nach der Dialyse	128
Abb. 35: Aktivität von dSPI gegen Papain nach Inkubation mit NaCl	129
Abb. 36: Aktivität von dSPI gegen Papain nach Inkubation mit Metallionen	130
Abb. 37: Aktivität von Papain in Gegenwart verschiedener Thiolreagenzien	131
Abb. 38: Aktivität von Papain in Gegenwart von mit amphiphilen Molekülen inkubiertem nSPI und dSPI	132
Abb. 39: Restaktivität von Papain in Gegenwart von <i>S. mobaraensis</i> -Kulturbrühenfiltrat in verschiedenen Verdünnungen	134
Abb. 40: Restaktivität von Papain in Gegenwart von dSPI-Dialysatextrakt-Mischungen	135
Abb. 41: Restaktivität von Papain in Gegenwart von nSPI und resuspendiertem Dialysat ...	137
Abb. 42: HPLC-ESI-Massenspektrum des papaininhibierenden Kofaktors von SPI nach der Dialyse und nach der Extraktion	139
Abb. 43: Vorhersage der putativen Sekundär- und Tertiärstrukturen des SPI von <i>S. mobaraensis</i>	141
Abb. 44: Strukturalignment von SPI mit EXLX1 und drei Familie 45 Glycosylhydrolasen	143
Abb. 45: Restaktivität von Gingipain K und Gingipain R1 im Kulturüberstand von <i>P. gingivalis</i> in Gegenwart variabler Mengen Holo-SPI (Endpunkt)	147
Abb. 46: Restaktivität von Gingipain K im Kulturüberstand von <i>P. gingivalis</i> in Gegenwart verschiedener Mengen Holo-SPI (zeitlicher Verlauf)	148
Abb. 47: Einfluss von Holo-SPI und DAIP auf das bakterielle Wachstum	150
Abb. 48: Erneute Anzucht von durch SPI wachstumsinhibierten pathogenen Bakterien auf inhibitorfreiem Columbia Blutagar	151
Abb. 49: Zytotoxische Wirkung von Holo-SPI auf RAW264.7-Zellen	152
Abb. 50: Durch Edman-Abbau sequenziertes N-terminales Peptid des Dispaseautolyse-induzierenden Proteins von <i>S. mobaraensis</i>	153
Abb. 51: Fragmentierungsmuster von gereinigtem DAIP nach Denaturierung mit SDS und unterschiedlichen Additiven	155
Abb. 52: Konzentrations- und zeitabhängige Autolyse von Dispase in Gegenwart von DAIP	156
Abb. 53: DAIP-Aktivität nach wiederholter Zugabe von Dispase	158
Abb. 54: C-Termini von Dispase und Thermolysin sowie weiterer ausgewählter Metalloproteasen	160

Abb. 55: RP-HPL-Chromatogramm und LC-ESI-Massenspektrum des synthetisierten Heptapeptids H_2N -KSFDAVG-COOH	161
Abb. 56: Hypothetische Hydrolyse von H_2N -KSFDAVG-COOH durch DAIP	162
Abb. 57: RP-HPL-Chromatogramm und LC-ESI-Massenspektren der Inkubation von H_2N -KSFDAVG-COOH mit DAIP	163
Abb. 58: N-Terminus der Transglutaminase von <i>S. mobaraensis</i>	166
Abb. 59: Sequenzalignment der bekannten N-terminalen Aminosäuresequenz des SSTI mit dem Subtilisin-Inhibitor von <i>S. albogriseolus</i> nach Schmidt <i>et al.</i>	168
Abb. 60: Codierende Nukleotidsequenz sowie die daraus abgeleitete Primärstruktur des <i>Streptomyces</i> -Subtilisin- und TAMEP-Inhibitors von <i>S. mobaraensis</i>	169
Abb. 61: Simulation der potentiellen Erkennungssequenzen für Signalpeptidasen in SSTI mittels SignalP 4.1 Server	170
Abb. 62: Sequenzalignment der vollständigen Aminosäuresequenz des SSTI mit den fünf Proteinen, die im Datenbankvergleich die höchste Homologie zeigten	171
Abb. 63: Vorhersage der putativen Sekundär- und Tertiärstruktur des SSTI von <i>S. mobaraensis</i>	173
Abb. 64: Codierende Nukleotidsequenz sowie die daraus abgeleitete Primärstruktur des Dispaseautolyse-induzierenden Proteins von <i>S. mobaraensis</i>	177
Abb. 65: Vorhersage der putativen Sekundär- und Tertiärstruktur des DAIP von <i>S. mobaraensis</i>	179
Abb. 66: Genetische Organisation der <i>tamep</i> -, <i>smmpi</i> - und <i>smmpii</i> -Gene im Genom von <i>S. mobaraensis</i>	181
Abb. 67: Sequenzalignment von TAMEP mit den homologen <i>S. mobaraensis</i> -Metalloproteasen I und II sowie dem durch Zotzel <i>et al.</i> bestimmtem N-terminalen Peptid des reifen Enzyms	182
Abb. 68: Codierende Nukleotidsequenz sowie die daraus abgeleitete Primärstruktur der Transglutaminase-aktivierenden Metalloprotease TAMEP von <i>S. mobaraensis</i>	183
Abb. 69: Primärstruktur der Transglutaminase-aktivierenden Metalloprotease von <i>S. mobaraensis</i> nach Zuordnung der Domänen nach Marchler-Bauer <i>et al.</i>	185
Abb. 70: Sequenzalignment der drei Rodline von <i>S. mobaraensis</i>	189
Abb. 71: Genetische Organisation der Rodlincodierenden Gene im Genom von <i>S. mobaraensis</i>	189
Abb. 72: Sequenzalignment der sechs Chapline von <i>S. mobaraensis</i> sowie Zuordnung der Domänen nach Elliot <i>et al.</i>	192
Abb. 73: Genetische Organisation der chaplincodierenden Gene im Genom von <i>S. mobaraensis</i>	194
Abb. 74: Genetische Organisation der signalpeptidasecodierenden Gene im Genom von <i>S. mobaraensis</i>	196
Abb. 75: Simulation der potentiellen Transmembranregionen für Signalpeptidasen am Beispiel von Sip1 mittels TMHMM-Server	198
Abb. 76: Sequenzalignment der fünf Klasse 1-Signalpeptidasen von <i>S. mobaraensis</i> mit SipX von <i>S. lividans</i> und SipS von <i>B. subtilis</i> sowie Zuordnung der Domänen nach van Dijk <i>et al.</i>	199
Abb. 77: Sequenzalignment von Lsp1 von <i>S. mobaraensis</i> mit den LspA von <i>S. coelicolor</i> A3(2) und <i>B. subtilis</i> sowie Zuordnung der Domänen nach Paetzel <i>et al.</i>	200

Abb. 78: Mutmaßliche Oberflächenstruktur des SSTI von <i>S. mobaraensis</i> mit putativer Subtilisin-Bindestelle und putativ für TGase zugänglichen Aminosäuren .	205
Abb. 79: Mutmaßliche Tertiärstruktur des DAIP von <i>S. mobaraensis</i> mit hervorgehobenen Aspartyl- und Glutamyresten der putativen Bindungsrinne	209
Abb. 80: Sequenzalignment neutraler Metalloproteasen mit TAMEP und DAIP von <i>S. mobaraensis</i>	210
Abb. 81: Schematische Darstellung des extrazellulären Kanals eines Luftmyzels von <i>S. mobaraensis</i> nach Vorstellung des Autors	223
Abb. 82: Schematische Darstellung der Transglutaminase-aktivierenden Metalloprotease von <i>S. mobaraensis</i> .	227

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Sequenzierte Genome von <i>Streptomyces</i> -Arten	5
Tab. 2:	Methode zur Bestimmung der Wirkung proteinöser Proteaseinhibitoren auf das Wachstum von <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	37
Tab. 3:	Wachstumsinhibition pathogener Bakterien unter Einfluss von SPI	37
Tab. 4:	Bestimmung der Zytotoxizität von SPI auf Säugerzellen	38
Tab. 5:	Isolierung genomischer DNA aus <i>S. mobaraensis</i> nach Tripathi und Rawal	40
Tab. 6:	Standardpipettierschema zur enzymatischen Hydrolyse von DNA	42
Tab. 7:	Standardpipettierschema für die Dephosphorylierung hydrolysierter DNA-Fragmente	43
Tab. 8:	Standardpipettierschema für die Ligation von Vektor- und Insert-DNA	44
Tab. 9:	Standardpipettierschema für eine Polymerasekettenreaktion	45
Tab. 10:	DNA-Reinigung oder -Konzentrierung mit GenElute™ PCR Clean-Up Kit	45
Tab. 11:	Pipettierschema für die Extraktion von DNA aus Agarosegelen	48
Tab. 12:	Pipettierschema für die Herstellung einer DIG-markierten DNA-Sonde mit Klenow-Fragment	50
Tab. 13:	Arbeitsprotokoll zum selektiven Nachweis von DNA durch Southern Blot-Analyse ...	52
Tab. 14:	Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen mit CaCl_2	55
Tab. 15:	Hitzeschock-Retransformation von chemisch-kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen mit Plasmid-DNA in Anlehnung an Froger und Hall	56
Tab. 16:	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen	58
Tab. 17:	Lokalisation der gesuchten Gene auf dem Genom von <i>S. mobaraensis</i>	59
Tab. 18:	Präparation von Einschlusskörpern aus <i>E. coli</i>	63
Tab. 19:	Rückfaltung denaturierter Proteine aus Einschlusskörpern	66
Tab. 20:	Parameter der IMAC im Standardverfahren	67
Tab. 21:	Ablaufschema der IMAC im Standardverfahren	67
Tab. 22:	Ablaufschema der IMAC im Batchverfahren	68
Tab. 23:	Parameter der AIC	69
Tab. 24:	Ablaufschema der AIC	70
Tab. 25:	Parameter für die KIC im Standard- und Batchverfahren	70
Tab. 26:	Ablaufschema für die KIC im Standardverfahren	71
Tab. 27:	Ablaufschema für die KIC im Batchverfahren	71
Tab. 28:	Herstellung von zwei SDS-Polyacrylamidelektrophoresegelen nach Lämmli	74
Tab. 29:	Anfärben von Polyacrylamidgelen durch Silberfärbung nach Blum <i>et al.</i>	76
Tab. 30:	Anfärben von Polyacrylamidgelen durch Coomassiefärbung nach Matsudaira	77

Tab. 31:	Durchführen der Western Blot-Analyse	79
Tab. 32:	Quantitative Bestimmung von Proteinkonzentrationen durch BCA-Assay nach Smith <i>et al.</i>	81
Tab. 33:	Bestimmung der proteolytischen Aktivität in Anlehnung an Anson	82
Tab. 34:	Substrate zur Bestimmung der inhibitorischen Aktivität papainähnlicher Proteasen durch SPI	83
Tab. 35:	Bestimmung der hydrolytischen Aktivität von Glykosylhydrolasen nach Bernfeld	84
Tab. 36:	Pipettierschema zur Bestimmung einer Aminopeptidaseaktivität mit <i>para</i> -Nitroaniliden.	86
Tab. 37:	Parameter der präparativen HPLC zur Überprüfung des Peptidsynthesergebnis	88
Tab. 38:	Parameter der analytischen HPLC zur Überprüfung der Peptidhydrolyse durch DAIP ..	88
Tab. 39:	Ablaufschema der präparativen und analytischen Auftrennungen über RP-HPLC	89
Tab. 40:	Parameter für die massenspektrometrische Untersuchung der Spaltsequenz von DAIP über LC-ESI-MS	89
Tab. 41:	Ablaufschema der der MS vorgeschalteten LC	90
Tab. 42:	Durchführung einer Festphasenpeptidsynthese nach Mitchell	92
Tab. 43:	Parameter für die Nano-HPLC-ESI-MS	93
Tab. 44:	Ablaufschema der Nano-HPLC	94
Tab. 45:	Ergebnis des NCBI-Datenbankvergleichs mit der aufgeklärten Primärstruktur von SPI	105
Tab. 46:	Restaktivität sekretierter Cysteinproteasen pathogener Bakterien im zellfreien Kulturüberstand bzw. der gereinigten Proteasen in Gegenwart von Holo-SPI	146
Tab. 47:	<i>Para</i> -Nitroanilid-Substrate zur Bestimmung einer Aminopeptidaseaktivität von DAIP	160
Tab. 48:	Ergebnis des NCBI-Datenbankvergleichs mit der aufgeklärten Primärstruktur von SSTI	172
Tab. 49:	Ergebnis des NCBI-Datenbankvergleichs unter Ausschluss von <i>Streptomyces</i> mit der aufgeklärten Primärstruktur von SSTI	175
Tab. 50:	Vergleich der Primärstruktur der drei Rodline Rdl1 - 3 von <i>S. mobaraensis</i> mit den zwei bekannten Rodlinien von <i>S. coelicolor</i> A3(2)	190
Tab. 51:	Vergleich der Anzahl an Lysin- und Glutaminresten in Rdl1, 2 und 3 von <i>S. mobaraensis</i> sowie RdlA und B von <i>S. coelicolor</i> A3(2) nach Abspaltung des Signalpeptids.....	190
Tab. 52:	Längen, Molmassen und pI der sechs Chapline von <i>S. mobaraensis</i>	193
Tab. 53:	Vergleich der Primärstruktur des langen Chaplins Chp1 von <i>S. mobaraensis</i> mit den drei bekannten langen Chaplinen ChpA, B und C von <i>S. coelicolor</i> A3(2)	194
Tab. 54:	Vergleich der Primärstruktur der fünf kurzen Chapline Chp2 - 6 von <i>S. mobaraensis</i> mit den fünf bekannten kurzen Chaplinen ChpD - H von <i>S. coelicolor</i> A3(2)	194
Tab. 55:	Längen, Molmassen und pI der fünf Signalpeptidasen von <i>S. mobaraensis</i>	197

Tab. 56: Potenzielle Autolyseposition von DAIP	211
Tab. 57: Von <i>S. mobaraensis</i> bevorzugte Nukleotidtripletts	254

Abkürzungsverzeichnis

A_x	Extinktion bei x nm
A. bidest.	Wasser in Milli-Q-Qualität
A. dest.	Wasser in Umkehrosmose-Qualität (VE)
aa / AS	Aminosäure
Abb.	Abbildung
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid
AIC	Anionenaustauschchromatographie
Amp	Ampicillin
APDS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
BCA	Bicinchoninsäure
BHI	Brain Heart Infusion-Medium
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
<i>C.</i>	<i>Cloristridium</i>
cfu	Colony forming units
CHAPS	3-[3-Cholamidopropyl]-dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat
Chp	Chaplin
CPD	Dinatrium 2-Chloro-5-(4-methoxyspiro[1,2-dioxetan-3,2'-(5-chlorotricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decan])-4-yl]-1-phenylphosphat
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
(k)Da	(Kilo)Dalton
DAIP	Dispaseautolyse-induzierendes Protein
Dbc / Dabcyl	Dimethylaminoazobenzolcarboxyl
DDM	Dodecyl- β -D-maltosid
DE3	T7-RNA-Polymerase des λ -Prophagen
DIG	Digoxigenin
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBB	Double-psi beta barrel
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
dSPI	dialysierter SPI
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDANS	Ethylendiaminonaphthalinsulfonsäure

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EK	Einschlusskörper
eq.	Äquivalentkonzentration/-menge
ESI-MS	Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie
EtOH	Ethanol
ExPASy	Expert Protein Analysis System
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FPLC	fast protein liquid chromatography
FRET	Förster -Resonanzenergietransfer
GPC	Gelpermeationschromatographie
GSH / GT	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
GYM	Glucose-Yeast-Malt
HBTU	O-(benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-Tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
His ₆	Hexahistidintag
I:E	Inhibitor-Enzym-Verhältnis
IAC	Ionenaustauschchromatographie
IgG	Immunglobulin G
IMAC	Immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IR	Infrarot
IU	Inhibitorunits
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaar
KIC	Kationenaustauschchromatographie
KPG	Gingipain K
LC	Flüssigchromatographie
LPA	N-Lauroylamido-3-N',N'-dimethylpropylamin
Lsp	Klasse 2-Signalpeptidase
M	DNA-/Proteinstandard
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
Mbp	Megabasenpaar
MCS	Multiple cloning site
ME	β-Mercaptoethanol
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie

MTBE	Methyl-tert-Butylether
MTP	Mikrotiterplatte
N	Anzahl durchgeführter Untersuchungen derselben Zusammensetzung
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEM	N-Ethylmaleinimid
NLS	N-Lauroylsarcosin
nOG	n-Octyl- β -D-glucopyranosid
nSPI	nativer SPI/SPI vor Dialyse
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
orf	Open Reading Frame
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PC	Phenol-Chloroform
PC	Protein-Convertase
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	Protein data base
pelB	Pektatlyase B-Signalpeptid von <i>Erwinia carotovora</i>
PHYRE	Protein Homology/Analogy Recognition Engine
pI	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pNA	<i>para</i> -Nitroanilid
PTP-SM	Prolyl-Tri-/Tetrapeptidylpeptidase von <i>S. mobaraensis</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rdl	Rodlin
RPG	Gingipain R1
RP-HPLC	Reverse phase-high performance liquid chromatography
rpm	Umdrehungen pro Minute
RSCB	Research Collaboratory for Structural Bioinformatics
rSPI	rekombinant hergestellter SPI
RT	Raumtemperatur
<i>S.</i>	<i>Streptomyces</i>
SapB	Surface associated protein B
ScNPI	<i>S. caespitosus</i> neutral protease inhibitor
SDS	Natriumdodecylsulfat

SGMP	<i>S. griseus</i> Metalloprotease
Sip	Klasse 1-Signalpeptidase
SmMP	<i>S. mobaraensis</i> Metalloprotease
SMPI	<i>Streptomyces</i> Metalloproteaseinhibitor
SPI	<i>Streptomyces</i> -Papaininhibitor
SSC	Salzhaltiger Natriumcitrat-Puffer
SSI	<i>Streptomyces</i> -Subtilisininhibitor
SspB	Staphopain B
SSTI	<i>Streptomyces</i> -Subtilisin- und TAMEP-Inhibitor
St.	<i>Staphylococcus</i>
STE	Saccharose-Tris-EDTA-Puffer
Sv.	<i>Streptoverticillium</i>
Tab.	Tabelle
TAMEP	Transglutaminase-aktivierende Metalloprotease
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TG	Thioglycerin
TG / TGase	Transglutaminase
TLCK	N ^α -Tosyl-L-lysinchloromethylketon
TMHMM	Transmembrane prediction using Hidden Markov Models
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tw20	Tween20
Tw80	Tween80
TX100	Triton X-100
U	Units
u.A.	unter Anderem
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
v / Vol	Volumen
V.	<i>Vibrio</i>
w	Gewicht
wtSPI	Wildtyp-SPI
x g	relative Zentrifugalbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
Y.	<i>Yersinia</i>

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. <i>Streptomyces</i>	1
1.1.1. Lebenszyklus von <i>Streptomyces</i>	2
1.1.2. Genetische Besonderheiten von Streptomyceten	4
1.1.3. <i>Streptomyces mobaraensis</i>	6
1.2. Transglutaminase	8
1.2.1. Katalytischer Mechanismus der bakteriellen TGase	10
1.2.2. Prozessierung der TGase	11
1.2.3. Regulation der TGase-Prozessierung	13
1.2.4. TGase-Substrate von <i>S. mobaraensis</i>	13
1.2.4.1. <i>Streptomyces</i> -Subtilisin- und TAMEP-Inhibitor SSTI	14
1.2.4.2. <i>Streptomyces</i> -Papaininhibitor SPI	15
1.2.4.3. Dispaseautolyse-induzierendes Protein DAIP	15
1.3. Aufbau der Lufthyphen - Genetische und proteinöse Regulation	16
1.3.1. Chapline und Rodline und ihre Funktion am Aufbau des Luftmyzels	17
1.3.2. Genetische Regulation der Lufthyphenbildung durch die <i>bld</i> -Gene	18
1.3.3. Weitere genetische Regulatoren	20
1.3.4. Proteinöse Regulation der Lufthyphenbildung	22
1.4. Aufgabenstellung	25
2. MATERIAL UND METHODEN	27
2.1. Material	27
2.1.1. Mikroorganismen	27
2.1.2. Verwendete Vektoren	27
2.1.3. Oligonukleotide	28
2.1.4. Peptide, Enzyme und Proteine	28
2.1.5. DNA-/Proteinstandards	29
2.1.6. Chemikalien, Feinchemikalien und Lösungsmittel	30
2.1.7. Aminosäuren für die Festphasensynthese	31
2.1.8. Verbrauchsmaterialien und Kits	31
2.1.9. Geräte	32
2.1.10. Festphasen für Chromatographie	33
2.1.11. Sonstiges	33
2.1.12. Software	33
2.2. Mikrobiologische Methoden	34
2.2.1. Submerskultivierung von <i>S. mobaraensis</i>	34
2.2.2. Platten- und Submerskultivierung von <i>E. coli</i>	35
2.2.3. Anlegen von <i>E. coli</i> -Cryostocks	36
2.2.4. Wachstumsinhibition von <i>E. coli</i> unter dem Einfluss von Proteaseinhibitoren	36
2.2.5. Wachstumsinhibition pathogener Bakterien unter Einfluss von SPI	37
2.2.6. Nähere Bestimmung der antibakteriellen Eigenschaften von SPI	38

2.2.7.	Bestimmung der Zytotoxizität von SPI auf Säugerzellen	38
2.3.	Molekularbiologische Methoden	39
2.3.1.	Isolierung genomischer DNA aus <i>S. mobaraensis</i>	39
2.3.2.	Restriktion von DNA	42
2.3.3.	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	42
2.3.4.	Ligation	43
2.3.5.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	44
2.3.6.	Reinigung und Konzentrierung von DNA mit GenElute™ PCR Clean-Up Kit	45
2.3.7.	Qualitative Agarose-Gelelektrophorese	46
2.3.8.	Präparative Agarose-Gelelektrophorese	47
2.3.9.	Markierung von DNA mit Digoxigenin (DIG)	49
2.3.10.	Southern Blot-Analyse	51
2.3.11.	Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen über CaCl ₂ -Methode	54
2.3.12.	Hitzeschock-Retransformation	56
2.3.13.	Hitzeschock-Transformation	57
2.3.14.	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> -Zellen mit E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit I	58
2.3.15.	Konzentrationsbestimmung von DNA-Proben	59
2.3.16.	Sequenzierung von DNA	59
2.3.17.	Blau-Weiß-Selektion nach Rüther	61
2.3.18.	Codonoptimierung des SPI-Gens	61
2.4.	Biochemische Methoden	62
2.4.1.	Homologe Produktion von SPI und Aufreinigung des Proteins aus der Kulturbrühe ..	62
2.4.2.	Heterologe Produktion von SPI und Rückfaltung aus Einschlusskörpern	62
2.4.2.1.	Präparation von Einschlusskörpern aus <i>E. coli</i>	63
2.4.2.2.	Rückfaltung von rekombinant hergestelltem Protein aus Einschlusskörpern	64
2.4.3.	Chromatographische Verfahren	66
2.4.3.1.	Immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie	66
2.4.3.2.	Anionenaustauschchromatographie	69
2.4.3.3.	Kationenaustauschchromatographie	70
2.4.4.	Dialyse	72
2.4.5.	Lyophilisation	72
2.4.6.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	72
2.4.7.	Färben von SDS-Polyacrylamidgelen	75
2.4.7.1.	Silber-Färbung nach Blum <i>et al.</i> , 1987	75
2.4.7.2.	Coomassie-Färbung nach Matsudaira, 1987	76
2.4.8.	Western Blot-Analyse	77
2.4.9.	Bicinchoninsäure-Test	80
2.4.10.	Azocasein-Assay zur Bestimmung proteolytischer Aktivität in Anlehnung an Anson .	81
2.4.11.	Inhibition der Aktivität papainähnlicher Proteasen durch SPI	82
2.4.12.	Bestimmung der hydrolytischen Aktivität von Glykosylhydrolasen nach Bernfeld .	84
2.4.13.	Aktivitätstest zur Bestimmung einer Aminopeptidaseaktivität mit <i>para</i> -Nitroaniliden ..	85
2.4.14.	Homologe Produktion von DAIP und Aufreinigung des Proteins aus der Kulturbrühe	86
2.4.15.	Ethanol-Fällung	87

2.5. Analytische und organochemische Verfahren.....	87
2.5.1 Umkehrphase-Hochleistungs-Flüssigchromatographie (RP-HPLC)	87
2.5.2 Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)	89
2.5.3 Festphasenpeptidsynthese (SPPS).....	90
2.5.4 Proteinsequenzanalyse durch Massenspektrometrie.....	93
2.5.4.1. LC-MS-MS-Analyse der tryptisch verdauten Proteinproben.....	93
3. ERGEBNISSE.....	95
3.1. Aufklärung des SPI-codierenden Gens	95
3.1.1. Erstellung einer SPI-spezifischen DNA-Sonde zur Detektion des Gens.....	95
3.1.2. Identifizierung des SPI-codierenden Gens.....	99
3.1.2.1. Sequenzierung der Klone 1 _H 7 und 6 _D 7	103
3.1.2.2. Charakterisierung des Papaininhibitors anhand seiner Primärstruktur.....	104
3.2. Rekombinante Produktion vom SPI in <i>E. coli</i>	107
3.2.1. Rekombinante Produktion von SPI mit His-Tag im Cytoplasma	108
3.2.2. Vermeidung der Bildung von Proteinaggregaten	109
3.2.3. Produktion von rSPI ins Periplasma.....	111
3.2.4. Rückfaltung von rSPI aus Einschlusskörpern	115
3.2.4.1. Bestimmung der optimalen Faltungsparameter.....	116
3.2.4.2. Produktion von rSPI in großen Volumina.....	122
3.3. Untersuchungen mit wtSPI von <i>S. mobaraensis</i>.....	125
3.3.1. Bestimmung der optimalen Kultivierungsdauer.....	125
3.3.2. Aufreinigung des wtSPI aus der Kulturbrühe	126
3.3.2.1. Vorreinigung der Kulturbrühe durch Temperatur.....	126
3.3.2.2. Vorreinigung der Kulturbrühe durch Abtrennung anionischer Bestandteile mittels Anionenaustauschchromatographie.....	127
3.3.3. Konzentration und Konservierung von SPI über Dialyse und Lyophilisation	127
3.3.3.1. Versuche zur Reaktivierung von dSPI mit Natriumchlorid	128
3.3.3.2. Versuche zur Reaktivierung von dSPI mit bivalenten Kationen.....	129
3.3.3.3. Versuche zur Reaktivierung von dSPI mit amphiphilen Molekülen	132
3.3.3.4. Versuche zur Reaktivierung von dSPI mit filtrierter Kulturbrühe von <i>S. mobaraensis</i>	133
3.3.3.5. Reaktivierung der inhibitorischen Aktivität des dSPI durch Inkubation mit lyophilisiertem Dialysat.....	134
3.3.3.6. Charakterisierung des Kofaktors.....	137
3.4. Klassifizierung von SPI	140
3.5. Antibakterielle Eigenschaften des Holo-SPI.....	144
3.5.1. Holo-SPI als Inhibitor gegen sekretierte Cysteinproteasen.....	145
3.5.2. Holo-SPI als wachstumsinhibierender Faktor gegen Mikroorganismen.....	148
3.5.3. Zytotoxizität des <i>Streptomyces</i> -Papaininhibitors gegenüber Säugerzellen	151
3.6. Charakterisierung des Dispaseautolyse-induzierenden Proteins DAIP.....	152
3.6.1. Fragmentierungsuntersuchungen von DAIP während der Denaturierung	154
3.6.2. Weitere Untersuchungen für den Nachweis einer enzymatischen Aktivität von DAIP	156

3.6.3.	Hemmung der autolyseinduzierenden Aktivität von DAIP.....	158
3.6.4.	Untersuchungen auf eine Aminopeptidaseaktivität von DAIP	159
3.6.5.	Untersuchungen auf eine Carboxypeptidaseaktivität des DAIP.....	160
3.7.	Strukturaufklärung von DAIP und anderer Proteine über bioinformatische Methoden	164
3.7.1.	Sequenzierung der genomischen DNA von <i>S. mobaraensis</i>	164
3.7.2.	Weiterführende Analyse der codierenden Gene für TGase, PTP-SM und SPI ...	165
3.7.2.1.	Transglutaminase.....	165
3.7.2.2.	Prolyl-Tri-/Tetrapeptidylaminopeptidase	166
3.7.2.3.	<i>Streptomyces</i> -Papaininhibitor.....	167
3.7.3.	Identifizierung der codierenden Gene für DAIP, SSTI und TAMEP sowie bioinformatische Charakterisierung der Proteine	167
3.7.3.1.	<i>Streptomyces</i> -Subtilisin- und TAMEP-Inhibitor.....	168
3.7.3.2.	Dispaseautolyse-induzierendes Protein.....	175
3.7.3.3.	Transglutaminase-aktivierende Metalloprotease.....	180
3.7.4.	Identifizierung und Charakterisierung der hyphenhüllebildenden Chapline und Rodline.....	187
3.7.4.1.	Rodline.....	187
3.7.4.2.	Chapline.....	191
3.7.5.	Signalpeptidasen	195
4.	DISKUSSION.....	201
4.1.	Der <i>Streptomyces</i> -Subtilisin- und TAMEP-Inhibitor	201
4.2.	Das Dispaseautolyse-induzierende Protein	205
4.3.	Der <i>Streptomyces</i> -Papaininhibitor	211
4.4.	Chapline und Rodline	217
4.5.	Aufbau der Lufthyphen	222
4.6.	Charakterisierung weiterer Proteine von <i>S. mobaraensis</i>	225
4.6.1.	Die Transglutaminase-aktivierende Metalloprotease	225
4.6.2.	Signalpeptidasen	229
5.	LITERATURVERZEICHNIS.....	233
6.	DANKSAGUNG	251
7.	ANHANG	254
7.1.	Zur Ableitung der Primer herangezogene Nutzungshäufigkeit der Codons bei <i>Streptomyces mobaraensis</i>	254
7.2.	Erklärungen	256
7.2.	Lebenslauf.....	258

1. Einleitung

1.1. Streptomyces

Streptomyceten sind ubiquitär vorkommende Gram-positive Bodenbakterien, die ein multizelluläres, pilzmyzelähnliches Wachstum mit einer komplexen Zelldifferenzierung aufweisen. Die Familie *Streptomycetaceae* gehört zur Gruppe der heterogenen Actinomyceten (Anné und Van Mellaert, 1993) und wurde früher in die Gattungen *Streptomyces* und *Streptoverticillium* unterteilt. Die Zuordnung erfolgte über chemotaxonomische und phänotypische Merkmale im Verlauf der Zelldifferenzierung (Miyadoh, 1990). Heute erfolgt sie jedoch meist über 16S rRNA-Analyse und/oder einer Kombination aus Zellwand-Chemotyp, Art und Aufbau des Peptidoglycans sowie des Zucker-, Fettsäure- und Phospholipidprofils (Kroppenstedt, 1985; Wellington *et al.*, 1992; Mehling *et al.*, 1995b, 1995a). Charakteristisch ist der GC-Gehalt des Streptomyceten-Genoms, der mit 69% bis 78% ungewöhnlich hoch ist (Enquist und Bradley, 1971). Im Vergleich weisen die im selben Habitat koexistierenden Spezies *Bacillus subtilis* und *Clostridium acetobutylicum* nur einen GC-Gehalt von durchschnittlich 43.5% bzw. 30.9% auf (Kunst *et al.*, 1997; Nolling *et al.*, 2001).

Mit über fünfhundert beschriebenen Arten und Unterarten stellen Streptomyceten die größte kultivierbare Gruppe in der Domäne *Bacteria* dar (Hain *et al.*, 1997). Wegen ihrer enormen biosynthetischen Variabilität stehen sie seit langem im wissenschaftlichen und industriellen Fokus. Streptomyceten verleihen dem Waldboden durch Produktion des bityklischen Alkohols Geosmin den charakteristischen Geruch (Gerber und Lechevalier, 1965). Außerdem produzieren sie noch weitere Metaboliten von hoher wirtschaftlicher und medizinischer Bedeutung (Omura, 1992; Hopwood, 2007). Bereits in den 1940ern wurde erstmals das Antibiotikum Streptomycin zur Behandlung von Tuberkulose genutzt (Schatz *et al.*, 1944). Ebenso stammen das Krebstherapeutikum Streptozocin, das seit 1982 in den USA als Medikament zugelassen ist, das Neurotoxin Avermectin oder auch Antibiotika wie z.B. Platensimycin von Streptomyceten (Murray-Lyon *et al.*, 1968; Hotson, 1982;

Wang *et al.*, 2006). Bis 1980 wurden mehr als 60% aller industriell genutzten natürlichen Antibiotika aus Streptomyceten isoliert (Berdy, 1980).

1.1.1. Lebenszyklus von *Streptomyces*

Der Lebenszyklus von Streptomyceten lässt sich in drei Phasen unterteilen: die Substrat-, Luftmyzel- und Sporenbildung (Chater, 1993). Beginnt eine Spore zu keimen (Abb. 1A), wächst ein weit verästeltes Substratmyzel in den Boden, das zur Zersetzung von polymeren Nährstoffen entsprechende Enzyme sekretiert (Abb. 1B,C). Erschöpfen sich mit der Zeit die Nährstoffe, so beginnt die Differenzierung zu einem Luftmyzel, das parasitär auf dem Substratmyzel wächst (Abb. 1D-F). Hierbei kommt es auch zur Sekretion verschiedener Antibiotika, die wahrscheinlich dazu dienen, die während der Differenzierung freigesetzten Stoffe vor im selben Habitat vorkommenden Bakterien wie *Bacillus* oder Pilzen zu schützen. Der Einzug neuer Zellwände in das Luftmyzel führt zur Ausbildung von Einzelkompartimenten, die weiter zu neuen Sporen differenzieren (Angert, 2005; Chater, 2011).

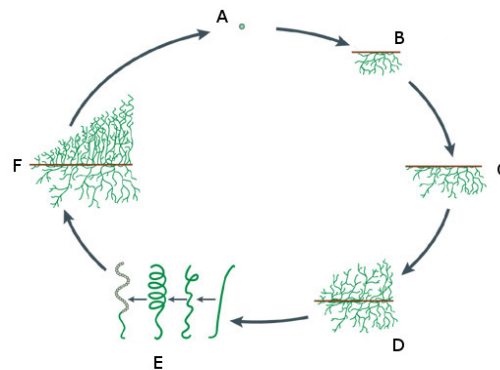


Abb. 1: Lebenszyklus von *S. coelicolor* A3(2): Unter optimalen Bedingungen bildet sich aus einer Spore (A) das Substratmyzel (B) aus. Durch Verlängerung und Verzweigung an den Enden der Hyphen breitet sich das Substratmyzel weiter in den Boden aus (C). Nach Erschöpfung der Nährstoffe oder durch anderweitige Verschlechterung der Lebensbedingungen kommt es zur Differenzierung bis hin zum Luftmyzel, welches parasitär auf dem Substratmyzel wächst (D). Durch verschiedene genetisch ausgelöste Prozesse entstehen aus dem Luftmyzel charakteristische spiralförmige Konidien. Der Einzug neuer Zellwände innerhalb des Luftmyzels führt zur Bildung von Einzelkompartimenten, die eine Sporenkette bilden (E, F). Durch Abtrennung und Verbreitung von Einzelsporen beginnt der Zyklus von vorne (Angert, 2005)

Als Substrat- oder vegetatives Myzel wird die Ausbreitung langer verzweigter Filamente (Hyphen) im Erdboden bezeichnet, die morphologisch dem Myzel

filamentöser Pilze ähneln. Die vegetativen Hyphen haben über ihre extrazelluläre Matrix eine hohe Affinität zu hydrophoben Oberflächen von Bodensubstraten, wodurch die Adhäsion gewährleistet wird (Del Sol *et al.*, 2007). Es konnte gezeigt werden, dass diese Matrix aus zwei Hauptkomponenten aufgebaut ist, einerseits aus einem Cellulose-Kern und andererseits aus einem daran gebundenen amyloiden Komplex, der aus stark oberflächenaktiven amphipathischen Proteinen, den Chaplinen und Rodlinen, besteht (Elliot *et al.*, 2003; de Jong *et al.*, 2009). Hierbei scheint die Cellulose die Selbstassemblierung der Chapline und Rodline zu unterstützen (Xu *et al.*, 2008; Chater *et al.*, 2010a). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass noch ein weiteres β -1,4-Glukan an der Ausbildung beteiligt sein muss, da bei Deletionsmutanten des Cellulosesynthetase-codierenden-Gens weder die Ausbildung der charakteristischen Fransenstruktur vollständig gehemmt wurde noch die Anfärbbarkeit mit glukonspezifischen Farbstoffen ausblieb (Chater, 2011). Im vegetativen Stadium ist das saprotrophische Bakterium durch Sekretion hydrolysierender Enzyme in der Lage, polymere Biomoleküle aus Substraten wie Holz, Blättern oder Insekten abzubauen und diese als Nährstoffe zu nutzen (Piepersberg *et al.*, 1993). Die strukturelle Komplexität und multizelluläre Differenzierung der Bakterien lässt trotz der prokaryontischen zellulären Organisation einen Vergleich mit höheren Organismen zu (Bruton *et al.*, 1995; Miguelez *et al.*, 2000; Kelemen *et al.*, 2001). So akkumulieren in den Bereichen des vegetativen Myzels, die am weitesten von der Wachstumszone entfernt sind, Speicherstoffe wie Glykogen, Lipide oder Polyphosphate (Brana *et al.*, 1986).

Verschlechtern sich die Lebensbedingungen, z.B. durch Erschöpfung der Nährstoffe oder andere Einflüsse, so differenzieren die immobilen Streptomyceten und beginnen, Luftmyzele auszubilden, welche parasitär auf dem Substratmyzel wachsen, und dabei die gespeicherten Nährstoffe für das eigene Wachstum nutzen (Brana *et al.*, 1986). Durch den Einbau von Zellwänden innerhalb des Luftmyzels und daraus folgender Ausbildung von Einzelkompartimenten kommt es in der späten exponentiellen Wachstumsphase zur Sporulation. Die hierdurch gebildeten Segmente, die

jeweils nur eine Genomkopie enthalten, bilden in der stationären Wachstumsphase eiförmige, dickwandige Exosporen, deren Durchmesser ca. 1 µm beträgt (Kalakoutskii und Agre, 1976; Hirsch und Ensign, 1978; Ensign, 1978; Garcia Diaz *et al.*, 1983). Diese zeichnen sich durch eine hohe Stabilität gegenüber mechanischer Behandlung (z. B. Ultraschall) oder Chemikalien (bis zu 0.01 M HCl) aus (Chater, 2011). Ebenso überstehen sie aufgrund der starren Zellwände sehr gut den Verdauungstrakt von Tieren, die streptomycetenhaltiges Material aufnehmen (Bloomfield und Alexander, 1967). Alle diese Eigenschaften führen dazu, dass die Sporen trockene Bedingungen überdauern können und so durch Verteilung über Wind und Tier der Fortpflanzung dienen (Mayfield *et al.*, 1972; Ensign, 1978; Kieser *et al.*, 2000). Die Sporen verschiedener Streptomyceten-Arten unterscheiden sich teilweise stark in ihrer Oberflächenstruktur. So ähnelt diese bei *S. coelicolor* A3(2) einem Korbgeflecht, welches durch Heterodimere aus Rodlinen und Chaplinen, beides amphipathische Oberflächenproteine, gebildet wird (Wildermuth, 1970a, 1971; Claessen *et al.*, 2002, 2004). *S. avermitilis* hingegen fehlen Rodlin-codierende Gene, wodurch die Sporenoberfläche glatt erscheint (Ikeda *et al.*, 2003, Chater, 2011). Neben diesen beiden Erscheinungsformen sind auch dornige, warzige oder auch haarige Oberflächen bekannt. Sehr wahrscheinlich dienen die verschiedenen Strukturen der Adhäsion an unterschiedlichen Substraten (Wildermuth, 1970a, 1972a, 1972b; Williams *et al.*, 1972). Durch Induktion der Keimung unter günstigen Wachstumsbedingungen beginnt ein neuer Lebenszyklus durch Ausbildung von Keimschläuchen und neuen Kolonien (Bibb *et al.*, 2000).

1.1.2. Genetische Besonderheiten von Streptomyceten

Die Genome der dreizehn bisher vollständig sequenzierten und publizierten Streptomycetenstämme weisen eine Größe von 7.7 bis 12.0 Mbp auf (Tab. 1) und sind somit etwa drei- bis viermal so groß wie das Genom anderer Actinomyceten-Arten wie z.B. *Mycobacterium tuberculosis* CDC 1551 (4.4 Mbp; Fleischmann *et al.*, 2002) oder *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (3.3 Mbp; Kalinowski *et al.*, 2003). Mit 7 825 vorhergesagten

protein codierenden Genen besitzt *S. coelicolor* A3(2) die höchste bisher für Bakterien beschriebene Anzahl (Bentley *et al.*, 2002). Im Vergleich hierzu sind für die Genome der koexistierenden Organismen *B. subtilis* und *C. acetobutylicum* nur ungefähr 4 000 bzw. 3 740 protein codierende Gene vorhergesagt (Kunst *et al.*, 1997; Nolling *et al.*, 2001).

Tab. 1: Sequenzierte Genome von *Streptomyces*-Arten

Stamm	Größe / Mbp	Referenz
<i>S. avermitilis</i> MA-4680	9.1	Ikeda <i>et al.</i> , 2003
<i>S. bingchenggensis</i> BCW-1	11.9	Wang <i>et al.</i> , 2010
<i>S. cattleya</i> NRRL 8057	8.1	Barbe <i>et al.</i> , 2011
<i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064	9.1	Song <i>et al.</i> , 2010
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	9.1	Bentley <i>et al.</i> , 2002
<i>S. flavogriseus</i> ATCC 33331	7.7	Anonymus
<i>S. griseus</i> subsp. <i>griseus</i> NBRC 13350	8.6	Ohnishi <i>et al.</i> , 2008
<i>S. hygroscopicus</i> subsp. <i>jinggangensis</i> 5008	10.4	Wu <i>et al.</i> , 2012
<i>S. pristinaespiralis</i> ATCC 25486	8.1	Anonymus
<i>S. scabies</i> 87.22	10.2	Bignell <i>et al.</i> , 2010
<i>S. svaceus</i> ATCC 29083	9.3	Anonymus
<i>S. venezuelae</i> ATCC 10712	8.2	Pullan <i>et al.</i> , 2011
<i>S. violaceus niger</i> Tu 4113	11.1	Anonymus

Alle Daten wurden der Datenbank des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>) entnommen (Stand: November, 2012)

Neben der Größe ist die Architektur des Genoms ein weiteres Merkmal, das *Streptomyces* von anderen Actinomyceten unterscheidet. So liegt die DNA des Chromosoms nicht zyklisch sondern linear vor und ist an den Enden jeweils kovalent an ein terminales Protein gebunden (Chaconas und Chen, 2005). Im Zentrum des Doppelstrangs befindet sich die sog. *core*-Region, in der neben dem Replikationsursprung (*oriC*) annähernd alle Haushalts-Gene wie z.B. codierende Gene für die Zellteilung, DNA-Replikation, Transkription und Translation sowie die Aminosäurenbiosynthese liegen (Bentley *et al.*, 2002).

Vergleichende Genomanalysen von *S. coelicolor* A3(2), *S. avermitilis*, *S. scabies* und *S. venezuelae* ergaben in der *core*-Region 3 566 orthologe Gene (Ventura *et al.*, 2007), was in etwa 50% des Pan-Genoms von *S. coelicolor* A3(2) ausmacht (7 825 codierende Gene; Bentley *et al.*, 2002). Für Sekundärmetabolite codierende Gene hingegen sind meistens in Genclustern innerhalb der terminalen Bereiche, den sog. Armen des Chromosoms, lokalisiert. Diese Anordnung erklärt, warum selbst Deletionsmutanten, denen bis zu 25% des Genoms fehlen, weiterhin lebensfähig sind (Piepersberg, 2002).

Innerhalb der terminalen Bereiche ist die genomische Integrität der Streptomyceten gering. 0.5% aller Sporen weisen hier Mutationen auf. Teilweise fehlen variable Bereiche vollständig, wodurch das Chromosom wegen der nicht mehr vorhandenen terminalen Proteine, die die lineare Form aufrecht erhalten, zyklisieren kann. Auch sind invers-verknüpfte Chromosomdimere beschrieben. Alle diese Effekte führen gemeinsam oder in Teilen zu einer noch höheren genetischen Instabilität in diesem Bereich und erklären die hohe Anfälligkeit von Streptomycetengenomen gegenüber Mutationen (Birch *et al.*, 1990; Leblond *et al.*, 1990; Redenbach und Altenbuchner, 2002).

1.1.3. *Streptomyces mobaraensis*

Die Produktion zahlreicher Sekundärmetabolite macht Streptomyceten für wissenschaftliche und industrielle Zwecke sehr wertvoll. Wegen seiner Fähigkeit, eine bakterielle Transglutaminase zu produzieren, ist *S. mobaraensis* in den Fokus der AG Fuchsbauer gerückt. Neben der wissenschaftlichen Bedeutung ist das Enzym durch seine Fähigkeit, Proteine irreversibel zu verknüpfen, ebenfalls für industrielle Zwecke interessant. Durch Einbau funktionalisierter Amine in ein Glutamindonorprotein oder funktionalisierter Glutaminylopeptide in ein Lysindonorprotein sind beliebige Proteinmodifikationen vorstellbar (Mariniello und Porta, 2005).

Große Unterschiede zu dem Labormodellstamm *S. coelicolor* A3(2) waren Ursache für die Einordnung von *S. mobaraensis* und anderer morphologisch und biochemisch ähnlicher Spezies in die Gattung *Streptoverticillium* (Sv.) vor

1990. Erst danach wurden Streptoverticillien aufgrund homologer 16S rRNA-Sequenzen in die Gattung *Streptomyces* eingegliedert (Witt und Stäckebrandt, 1990). Während *S. coelicolor* A3(2) auf Nähragarmedium baumwollartig wächst, bildet *S. mobaraensis* doldenartige Sporophoren aus. Die Sporenhüllstruktur von *S. mobaraensis* ist resistent gegenüber Lysozym und Neomycin (Korn-Wendisch und Kutzner, 1981), das Substratmyzel zeichnet sich durch eine große Hitzestabilität von bis zu 100 °C aus (Zotzel, 2002).

Der Besitz eines Transglutaminasegens, das selbst im Genom von *S. coelicolor* A3(2) nicht vorkommt, unterscheidet *S. mobaraensis* von anderen Streptomyceten. Transglutaminase könnte daher im Zusammenhang mit der abweichenden Morphologie und Entwicklung des ehemaligen *Sv. mobaraense* stehen (Zotzel, 2002). Im Rahmen seiner Arbeit konnte Zotzel nachweisen, dass bei Kulturen von *S. mobaraensis* auf Agarplatten TGase-Aktivität ausschließlich in der Nähe der Lufthyphen zu finden ist, wobei sich das Enzym mit keinem geeigneten Puffer extrahieren ließ. In Submerskultur wird TGase jedoch in die Kulturbrühe ausgeschieden (Zotzel, 2002; Schmidt, 2008). Seit langem ist bekannt, dass die für den Sauerstoffeintrag notwendige Bewegung von Submerskulturen das Lufthyphenwachstum und die Sporulation bei Streptomyceten einschränkt. Diese Beobachtung legt ebenfalls nahe, dass die Freisetzung von TGase in das Flüssigmedium damit zusammen hängt. Vermutlich wird die autokatalytische Verankerung des Enzyms in die Zellwand mechanisch verhindert. Ein positiver Zusammenhang zwischen Transglutaminase-Produktion und Sporulation wurde bereits bei *B. subtilis* festgestellt (Kobayashi, 1996; Ragkousi und Setlow, 2004; Zilhao *et al.*, 2005). Cadaverin, ein Hemmstoff der Proteinvernetzung durch TGase, vermindert bei Kultivierung von *S. mobaraensis* auf festem Medium die Entstehung von Lufthyphen (Schmidt, 2008) und damit auch die Sporenbildung. Diese Beobachtung unterstreicht die Bedeutung von TGase für das Bakterium in seinen Reproduktionsphasen.

1.2. Transglutaminase

Transglutaminasen (Proteinglutamin- γ -Glutamyltransferasen, EC 2.3.2.13) gehören zur Enzymklasse der Transferasen. Sie zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, Glutaminsubstrate mit einer Vielzahl von Amindonoren irreversibel zu verknüpfen und so modifizierte Glutaminreste zu erzeugen. Handelt es sich beim Amindonor um proteingebundenes Lysin, so kommt es zur Vernetzung der Proteine unter Ausbildung einer Isopeptidbindung. TGasen kommen in vielen unterschiedlichen Lebewesen vor (Makarova *et al.*, 1999). Die am besten charakterisierten Vertreter dieser Enzymklasse sind der für die Blutgerinnung mitverantwortliche humane Faktor XIII (FXIII) und die von verschiedenen Gewebezellen sezernierten TG1, TG2 und TG3. Eukaryontische TGasen sind homolog zu Cysteinproteasen wie Calpain und Caspasen, weswegen sie auch in dieselbe Subfamilie eingegliedert werden (Pedersen *et al.*, 1994; Hubbard *et al.*, 1999). Außerdem sind sie calciumabhängig (Chung, 1972; Greenberg *et al.*, 1991), wohingegen das bakterielle Enzym, das 1989 von Ando *et al.* im Rahmen eines Enzymscreenings entdeckt wurde, keine Calciumionen benötigt (Ando *et al.*, 1989). Das bakterielle Enzym (Abb. 2) unterscheidet sich auch in Primärstruktur, Aussehen und Größe von den eukaryontischen Analoga (Abb. 3).

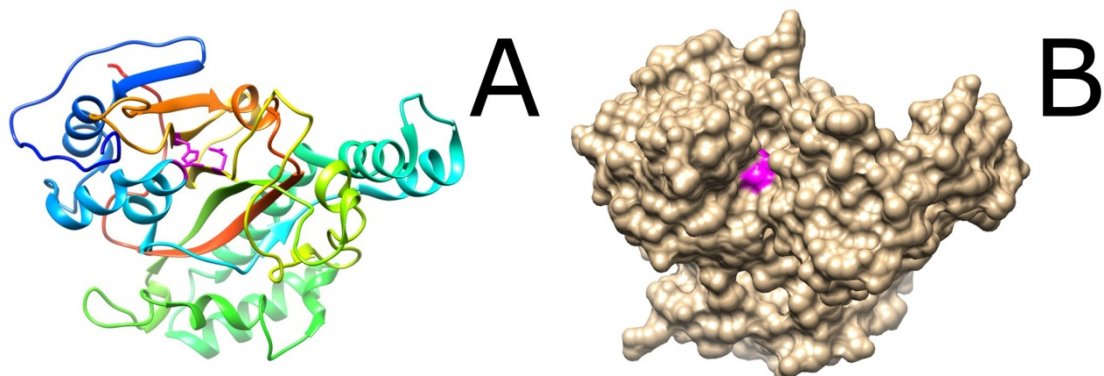


Abb. 2: Tertiärstruktur der bakteriellen Transglutaminase nach Kashiwagi *et al.*, 2002 (A: Bänderstruktur; B: Oberflächenmodell): Das Enzym besitzt eine scheibenartige Struktur aus acht β -Faltblättern, die von dreimal drei α -Helices umgeben sind. Zentral ist die Rinne erkennbar, in der die für die Katalyse verantwortlichen Cys64, Asp255 und His274 sitzen (magenta eingefärbt). Abbildung erstellt mit der Software Chimera auf Basis des PDB-Eintrags 1IU4.

10 20 30 40 50 60 70
 DSDDRVTTPA EPLDRMPDPY RPSYGRAETV VNNYIRKWQQ VYSHRDGRKQ QMTEEQREW L SYGCVGVTVV
 80 90 100 110 120 130 140
 NSGQYPTNRL AFASFDEDRF KNELKNGRPR SGETRAEFEG RVAKESFDEE KGFQRAREVA SVMNRALENA
 150 160 170 180 190 200 210
 HDESAYLDNL KKELANGNDA LRNEDARSPF YSALRNTPSF KERNGGNHDP SRMKAVIYSK HFWSGQDRSS
 220 230 240 250 260 270 280
 SADKRKYGDF DAFRPAPGTG LVDMSRDRNI PRSPTSPGEG FVNFDYGVFG AQTEADADKT VWTGHNHYHA
 290 300 310 320 330
 PNGSLGAMHV YESKFRNWSE GYSDFDRGAY VITFIPKSWN TAPDKVKQG W P

A

10 20 30 40 50 60 70
 GVNLEQFLNV TSVHLFKERW DTNKVDHHTD KYENNKILIV RGQSFYVQID FSRPYDPRRD LFRVEYVIGR
 80 90 100 110 120 130 140
 YPQENKGTII PVPIVSELQS GKWGAIVMR EDRSVRLSIQ SSPKCIVGKF RMYVAVWTPY GVLRTSRNPE
 150 160 170 180 190 200 210
 TDYIILFNPW CEDDAVYLDN EKEREYVLN DIGVIFYGEV NDIKTRWSY GQFEDGILDT CLYVMDRAQM
 220 230 240 250 260 270 280
 DLSGRGNPIK VSRVGSAMVN AKDDEGVLVG SWDNIYAYGV PPSAWTGSVD ILLEYRSSEN FVRYGQCWVF
 290 300 310 320 330 340 350
 AGVFNTFLRC LGIPARIVTN YFSAHDNDAN LQMDIFLEED GNVNSKLT KD SVWNYHCWNE AWMTRPDLPV
 360 370 380 390 400 410 420
 GFGGWQAVDS TPQENS DGM Y RCGPASVQAI KHGHVCFQFD APFVFAEVNS DLIYITAKD GTHVVENVDA
 430 440 450 460 470 480 490
 THIGKLIVTK QIGGDGMDI TDYKFQEGQ EBERLALETÄ LMYGAKKPLN TEGVMKSRSN VDMDFEVENA
 500 510 520 530 540 550 560
 VLKDFKLSI TFRNNSHNRY TITAYLSANI TTYTGVPKAE FKKETFDVTL EPLSFKKEAV LIQAGEYMGQ
 570 580 590 600 610 620 630
 LLEQASLHFF VTARINETRD VLAKQKSTVL TIPEIIKVR GTQVVGSDMT VTVQFTNPLK ETLRNVVWHL
 640 650 660 670 680 690
 DGPVTRPMK KMFREIRPNS TVQWEEVCRP WVSGHRKLIÄ SMSSDSL RHV YGELDVQIQ RPSM

B

Abb. 3: Primärstruktur der bakteriellen Transglutaminase von *S. mobaraensis* (A) und der A-Kette von humanem Faktor XIII (B): Dargestellt sind die reifen Enzyme. Rot markiert sind Aminosäuren der katalytischen Triade (Alle Daten wurden der ExPASy-Datenbank entnommen, Stand: Dezember, 2012)

1993 gelang es Kanaji *et al.*, die Primärstruktur der bakteriellen TGase durch vollständige Proteinsequenzierung zu bestimmen (Kanaji *et al.*, 1993). Kurz darauf folgte die Aufklärung der Nukleotidsequenz sowie die Klonierung und Expression in *S. lividans* (Washizu *et al.*, 1994), jedoch mit einer falschen Propeptidsequenz, was später durch Pasternack *et al.* korrigiert wurde (Pasternack *et al.*, 1998). Mit einer Größe von 37.9 kDa ist das reife Enzym nur halb so groß wie eine Untereinheit von FXIII (Chung, 1972), hat aber fast die

gleiche Aminosäureanzahl der FXIII-Kerndomäne mit dem Aktivzentrum (331 aa vs 332 aa).

2002 folgte durch Röntgenstrukturanalyse die Aufklärung der Tertiärstruktur durch Kashiwagi (Kashiwagi *et al.*, 2002). So zeigte sich, dass das reife Enzym wie eine runde Scheibe aufgebaut ist, in deren Mitte sich eine tiefe Rinne befindet. Hier liegen die drei Aminosäuren Cys64, Asp255 und His274, die gemeinsam das Aktivzentrum bilden (Abb. 2).

1.2.1. Katalytischer Mechanismus der bakteriellen TGase

Transglutaminasen verknüpfen irreversibel peptidgebundene Glutaminereste mit primären Aminen unter Ausbildung einer Isopeptidbindung. Das Substratspektrum der bakteriellen Transglutaminase zeichnet sich dadurch aus, dass auf der einen Seite ausschließlich peptidgebundenen Glutamin, auf der anderen Seite jedoch sämtliche Varianten von primären Aminen und Polyaminen akzeptiert werden (Ohtsuka *et al.*, 2000). Ebenso kann Wasser als Zweitsubstrat dienen, wenn kein Amino donor verfügbar ist. Hierdurch kommt es zur Deamidierung der Glutaminseitenkette und Bildung von Glutamat (Nemes *et al.*, 2005; Sarafeddin *et al.*, 2009). Handelt es sich bei beiden Substraten um proteingebundenes Glutamin bzw. Lysin, so kommt es zur Ausbildung von intra- oder intermolekularen N^{ϵ} -(γ -Glutamyl)-L-lysin-Isopeptidbindungen und damit zur Verknüpfung der beiden Proteine, wodurch hochmolekulare Aggregate entstehen können (Folk und Finlayson, 1977; Lorand und Conrad, 1984; Nonaka *et al.*, 1989). Der hypothetische Katalysemechanismus ist in Abb. 4 dargestellt.

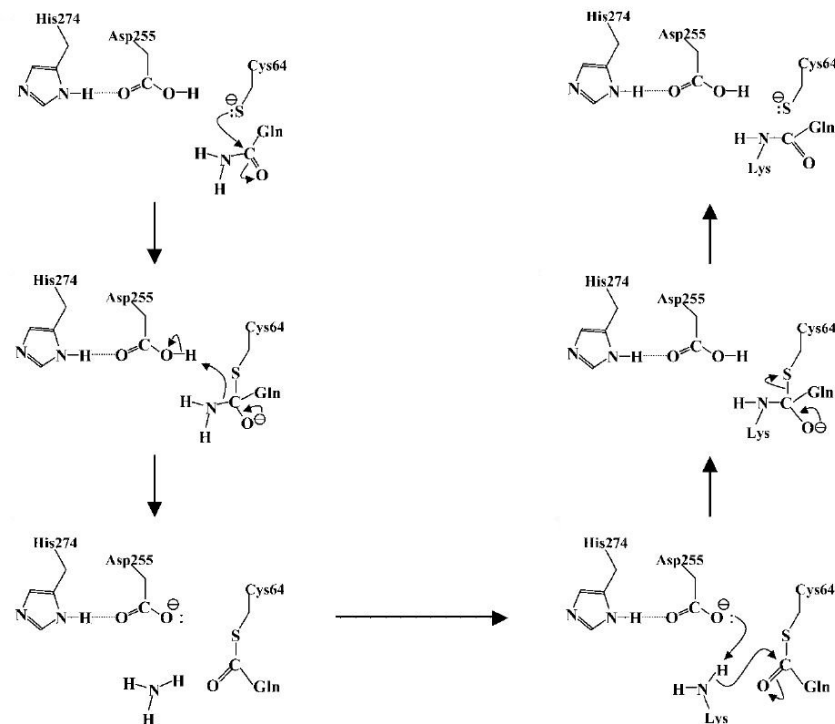


Abb. 4: Hypothetischer Katalysemechanismus der bakteriellen Transglutaminase nach Kashiwagi *et al.*, 2002

1.2.2. Prozessierung der TGase

TGase wird wie andere sekretorische Proteine von Gram-positiven Bakterien als Prä-Pro-Enzym translatiert (Silhavy *et al.*, 1983; Eckhardt *et al.*, 1987). Nach dem Transport des inaktiven Zymogens durch die Plasmamembran mit Entfernung des Signalpeptids erfolgt stufenweise die Aktivierung durch proteolytische Abspaltung von Peptiden unterschiedlicher Größe (Pasternack *et al.*, 1998; Zotzel *et al.*, 2003a, 2003b). Die Primärstruktur sowie die proteolytischen Schnittstellen sind in Abb. 5 dargestellt (Kanaji *et al.*, 1993; Zotzel, 2002).

Das N-terminale Signalpeptid ist 31 aa lang und weist den typischen Aufbau für einen Transport über den Sec-Signalweg auf. So befinden sich in der n-Region vier basische Arginin-Reste (in Abb. 5 grün markiert), denen eine Mehrzahl an hydrophoben Aminosäuren in der h-Region sowie die Signalpeptidase-Erkennungssequenz Ala-Xaa-Ala (hier Xaa = Ala; blau) in der c-Region folgen (Martoglio und Dobberstein, 1998). Ein vorhandenes Cystein

(unterstrichen) weist auf eine mögliche Verankerung in der Plasmamembran hin. Bisher wurde nicht aufgeklärt, welches Enzym für die Abtrennung der Signalsequenz verantwortlich ist (Braun und Tommassen, 1998).

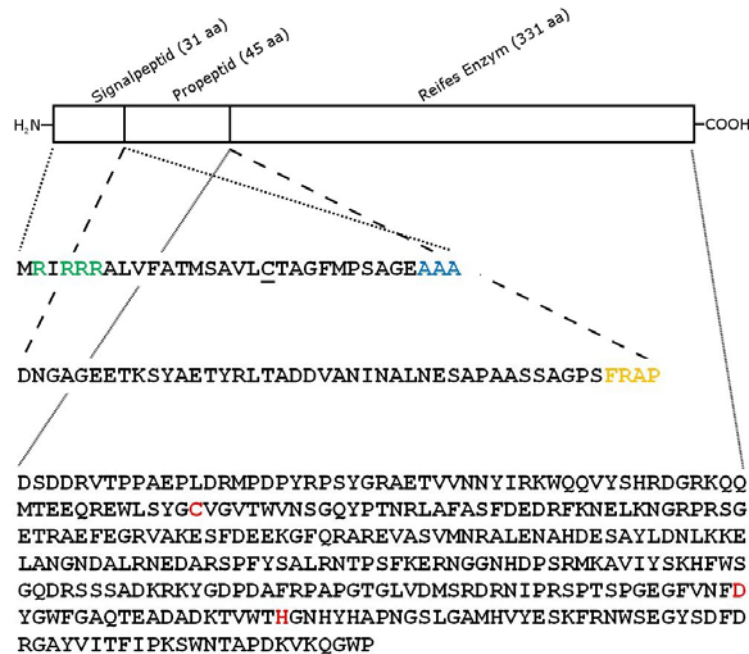


Abb. 5: Primärstruktur der Transglutaminase von *S. mobaraensis* mit proteolytischen Schnittstellen: Grün markiert sind die N-terminalen Argininreste der Präsequenz, blau das Signalpeptidasebindemotiv, gelb das nach der Aktivierung verbleibende FRAP-Tetrapeptid, rot die Aminosäuren der katalytischen Triade und unterstrichen der Cysteinrest, der für eine theoretische Verankerung zur Verfügung stehen kann (Kanaji *et al.*, 1993; Zotzel, 2002)

Das Propeptid der Transglutaminase ist 45 aa lang und blockiert nach der Sekretion wie ein Deckel das Aktivzentrum des Enzyms und damit auch die Vernetzung von Proteinen. Zusätzlich erhöht es die Thermostabilität im Vergleich zum reifen Enzym (Pasternack *et al.*, 1998). Die Abspaltung des Propeptids und, damit einhergehend, die Aktivierung des Enzyms erfolgt durch Öffnung der Peptidbindung zwischen den Aminosäuren Ser an Position -5 und Phe an Position -4 durch die Transglutaminase-aktivierende Metalloprotease (TAMEP), wobei ein Tetrapeptid aus Phe, Arg, Ala und Pro N-terminal verbleibt (gelb). Trotzdem weist das Enzym bereits jetzt vollständige Aktivität auf (Zotzel *et al.*, 2003a, 2003b).

Im letzten Prozessierungsschritt erfolgt die Abspaltung des verbliebenen FRAP-Tetrapeptids durch eine Prolyl-Tri-/Tetrapeptidylaminopeptidase

(PTP-SM), welche durch geringe Mengen an Ca^{2+} stimuliert werden kann. Zotzel *et al.* stellten eine hohe Spezifität der PTP-SM bezüglich der FRAP-TGase fest und schlossen daraus auf eine temporäre Verankerung der TGase in der Mureinschicht durch ionische Wechselwirkungen über das positiv geladene Arginin, was eine weitere lokale Feinregulierung der Enzymaktivität innerhalb der Zelle zur Folge haben könnte (Zotzel *et al.*, 2003b).

1.2.3. Regulation der TGase-Prozessierung

Da TGase durch ihre Fähigkeit, Proteine miteinander zu vernetzen, eine toxische Wirkung auf den Organismus haben kann, bedarf es einer strengen Regulation der Enzym-Prozessierung, um eine verfrühte und fehllokalisierte Aktivierung der Transglutaminase zu verhindern. Untersuchungen zeigten, dass die TAMEP durch ein Protein aus der Familie der *Streptomyces*-Subtilisin-Inhibitoren (SSI) gehemmt wird (Kuramoto *et al.*, 1996).

Der von *S. mobaraensis* produzierte Inhibitor SSTI (*Streptomyces*-Subtilisin- und TAMEP-Inhibitor) ist ein doppelköpfiger Inhibitor mit je einer Bindestelle für Serin- und Metalloproteasen (Hiraga *et al.*, 2000). Durch seine hemmende Wirkung auf TAMEP hat das Protein somit einen direkten Einfluss auf die Aktivierung der TGase. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass SSTI durch die PTP-SM verkürzt wird, wodurch die Inhibitoraktivität abnimmt. In der Annahme, dass TGase durch das N-terminale FRAP-Tetrapeptid lokal reguliert wird, nimmt die Peptidase somit auf zwei unterschiedliche Weisen Einfluss auf die bakterielle Proteinvernetzungsaktivität. Gleichzeitig konnte nachgewiesen werden, dass SSTI ein Substrat der bakteriellen TGase ist, was eine besondere Stellung im Rahmen der Regulation nahe legt (Schmidt, 2008; Schmidt *et al.*, 2008; Chater, 2011).

1.2.4. TGase-Substrate von *S. mobaraensis*

Durch Arbeiten zur biologischen Funktion von Transglutaminase im Lebenszyklus von *S. mobaraensis* konnten in der AG Fuchsbauer bisher drei proteinöse Enzymsubstrate in der Submerskultur des Bakteriums

nachgewiesen werden (Schmidt *et al.*, 2008; Sarafeddinov *et al.*, 2009, 2011). Auffallend daran ist, dass es sich bei allen drei Proteinen um Inhibitoren gegen Proteasen aus unterschiedlichen Familien handelt. Erwähnt wurde bereits der *Streptomyces*-Subtilisin- und TAMEP-Inhibitor (SSTI), der anhand der Homologie im sequenzierten N-Terminus der großen Familie der *Streptomyces*-Subtilisin-Inhibitoren (SSI) zugeordnet wurde (Schmidt *et al.*, 2008). Zusätzlich identifiziert wurden der *Streptomyces*-Papaininhibitor (SPI), der im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht wurde, und das Dispaseautolyse-induzierende Protein (DAIP), für das bisher kein Analogon in den Datenbanken zu finden ist und das ebenfalls Teil dieser Arbeit war (Schmidt, 2008; Schmidt *et al.*, 2008; Sarafeddinov *et al.*, 2009). Alle Proteine wirken als Antagonisten gegen Proteasen verschiedener Mikroorganismen, die mit *S. mobaraensis* im gleichen Lebensraum auftreten. Sie lassen sich wie TGase nicht nachweisen, wenn *S. mobaraensis* auf Platte kultiviert wird, werden aber in einer Submerskultur, wo die Ausbildung der Lufthyphen mechanisch gestört ist, in einem frühen Stadium sezerniert (Schmidt, 2008). Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass alle Inhibitoren zur Abwehr von Proteasen, die von Nahrungskonkurrenten oder symbiotischen Pilzen oder Bakterien ins Medium sekretiert werden, in die Lufthyphen eingebaut werden (Sarafeddinov *et al.*, 2011).

1.2.4.1. *Streptomyces*-Subtilisin- und TAMEP-Inhibitor SSTI

SSTI ist ein homodimeres Protein mit einer Molmasse von 2x14 kDa und weist eine hohe Thermostabilität auf (Schmidt, 2008). Zurzeit werden u.A. zwei Inhibitorklassen bei Streptomyceten unterschieden. Einerseits die bereits erwähnten *Streptomyces*-Subtilisin-Inhibitoren (SSI), die eine Aktivität gegenüber Serinproteasen wie Subtilisin, aber teilweise auch gegen Trypsin oder Chymotrypsin, aufweisen, und andererseits die *Streptomyces*-Metalloprotease-Inhibitoren (SMPI). Beide Inhibitorklassen hemmen jeweils nur eine Proteasefamilie und weisen nur wenig Homologien zueinander auf (Oda *et al.*, 1979; Taguchi *et al.*, 1994). SSTI wurde aufgrund seiner N-terminalen Sequenz der Familie der SSI zugeordnet, besitzt hingegen als doppelköpfiger

Inhibitor funktionelle Merkmale beider Inhibitorfamilien (Hiraga *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2008).

1.2.4.2. Streptomyces-Papaininhibitor SPI

Der *Streptomyces*-Papaininhibitor (SPI) war das zentrale Thema dieser Arbeit. Das monomere Protein ist ca. 12 kDa groß und besitzt einen apparenten pI von 7.3. Neben der namensgebenden Protease Papain werden noch andere Cysteinproteasen wie Bromelain oder die Serinprotease Trypsin gehemmt, wenn auch in geringerem Maße (Sarafeddinov *et al.*, 2011). SPI zeichnet sich wie SSTI durch eine hohe Hitzestabilität aus. Nach Inkubation für 60 min bei Siedetemperatur weist das Protein einen Aktivitätsverlust von nur 30% auf (Sarafeddinov *et al.*, 2011).

Die N-terminale Sequenzierung des Proteins *via* Edman-Abbau ergab eine zwanzig Aminosäuren lange Sequenz, für die beim Datenbankabgleich bisher kein vergleichbares Protein mit bekannter Funktion gelistet war. SPI zeigte hier nur eine Homologie zu einem putativen Protein von *S. lavendulae* (Swiss-Prot: Q9X5U4; 71% im N-Terminus). Die berechnete Molmasse jenes putativen reifen Proteins ergibt einen Wert von 11 943 Da, was der apparenten Molmasse von SPI mit 12 kDa sehr nahe kommt. Außerdem weist die Primärstruktur vier Cysteinreste auf, jedoch außerhalb der N-terminalen homologen Bereiche. Durch Vergleich der N-terminalen Sequenz ließ sich SPI weder der SSI- noch der SMPI-Familie zuordnen (Sarafeddinov *et al.*, 2011). Ebenso besteht keine Homologie zur Cystatin-Superfamilie. Alle Ergebnisse deuten daraufhin, dass SPI eine neue Inhibitorklasse definiert.

1.2.4.3. Dispaseautolyse-induzierendes Protein DAIP

Das 37 kDa große thermolabile Dispaseautolyse-induzierende Protein (DAIP) kann nach heutigem Stand nicht direkt als Inhibitor bezeichnet werden, da es anscheinend einem völlig anderen Wirkmechanismus unterliegt. Diesen Wirkmechanismus aufzuklären war ebenfalls Thema der vorliegenden Arbeit.

DAIP inaktiviert neutrale Metalloproteasen der M4-Familie wie Dispase, indem es ihre Autolyse einleitet. Bereits bei einem Dispase:DAIP-Verhältnis von 10:1 und einer Inkubationszeit von 30 min ist das Enzym vollständig fragmentiert. Neben Dispase induziert DAIP bei Thermolysin ebenfalls die Autolyse, von der hingegen weder TAMEP noch Collagenase von *Cl. histolyticum* betroffen sind. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Wirkung nicht auf einem Chelateffekt beruht. Ebenso wurde eine endoproteolytische Aktivität ausgeschlossen (Sarafeddinov *et al.*, 2009). Außerdem besitzt DAIP offensichtlich wie SSTI antibiotische Eigenschaften (Sarafeddinov *et al.*, 2009).

1.3. Aufbau der Lufthyphen - Genetische und proteinöse Regulation

Das zweite große Thema dieser Arbeit war die genauere Betrachtung des Lufthyphenaufbaus. Dies geschah durch Annotierung von solchen Genen, die für am Aufbau involvierte Proteine codieren.

Das normale Habitat von Streptomyceten ist der feuchte Boden. Hier keimen die Sporen und bilden unter guten Bedingungen ein neues vegetatives Substratmyzel aus, das in feuchtes Material wie Blätter, Holz, Tierkörper oder Insekten durch Sekretion entsprechender Enzyme unter Zersetzung eindringt. Hierdurch werden Kohlenstoff, Stickstoff, Phosphor, Schwefel, Mineralien und Spurenelemente resorbiert. Bei Mangel eines das Wachstum limitierenden Faktors differenziert das Substratmyzel zum Luftmyzel (Abb. 1).

Für ein Wachstum aus dem feuchten Boden heraus ist es notwendig, die Oberflächenspannung des Wassers zu senken. Durch Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass SapB (Spore associated protein B), ein hoch-modifiziertes amphipathisches Oligopeptid von *S. coelicolor* A3(2) aus 18 aa (Willey *et al.*, 1991; Ma und Kendall, 1994; Kodani *et al.*, 2004), in der Lage ist, die Oberflächenspannung von Wasser von 72 auf 39 mJ m⁻² zu senken (Richter *et al.*, 1988). SapB wird bereits im frühen Stadium der Hyphenbildung ins Medium sekretiert, wodurch es zu einer Akkumulation an der Wasseroberfläche und

dadurch zu einem Absenken der Oberflächenspannung kommt. In den sich anschließenden Entwicklungsstadien erfolgt die kontinuierliche Produktion des Oligopeptids. Der Nachweis in der sich ausbildenden Hyphenhülle gelang jedoch nicht, weil das Peptid vermutlich weiterhin im feuchten Milieu verbleibt, um die Oberflächenspannung dauerhaft niedrig zu halten (Wösten und Willey, 2000). Zusätzlich zu SapB erfolgt die Sekretion von kleinen Chaplinen, welche einerseits ebenfalls die Oberflächenspannung senken und andererseits für den Aufbau der Hyphenhülle benötigt werden (Claessen *et al.*, 2003). Dabei handelt es sich um Proteine mit einer hydrophilen Seite, die der hydratisierten Zellwand zugewandt ist, und einer hydrophoben Seite in Luftausrichtung (Chater, 2011). Die äußere Hülle ist für die weitere Differenzierung der Lufthyphen essenziell (Glauert und Hopwood, 1961; Wildermuth *et al.*, 1971; Garcia, 1995; Elliot *et al.*, 2003; Elliot und Talbot, 2004; Claessen *et al.*, 2002, 2003, 2004) und setzt sich größtenteils aus Chaplinen zusammen.

1.3.1 Chapline und Rodline und ihre Funktion am Aufbau des Luftmyzels

S. coelicolor A3(2) besitzt in seinem Genom insgesamt acht verschiedene Chaplingene, die für drei lange Proteine mit 210-230 aa (ChpA, B und C) sowie fünf kurze Peptide mit 50-60 aa (ChpD – H) codieren. Sowohl die kurzen als auch die langen Chapline besitzen hydrophobe Domänen aus ungefähr 40 aa, die aus 60-65% unpolaren Aminosäuren bestehen. Kurze Chapline besitzen die hydrophobe Domäne einmal, lange Chapline zweimal (Elliot *et al.*, 2003). Daneben ist bei den langen Chaplinen noch ein C-terminales Sortase-Bindemotiv vorhanden, wodurch deren Verankerung mit dem Peptidoglycan möglich ist. Der auf die Verankerung folgende Bereich dient als Verbindungsglied zwischen Zellwand und Hyphenhülle, die wiederum u.A. aus den hydrophoben Bereichen der langen sowie den kurzen Chaplinen selbst aufgebaut ist (Elliot *et al.*, 2003; de Jong *et al.*, 2009). Elliot *et al.* konnten jedoch auch zeigen, dass die großen Chapline für funktionsfähige Lufthyphen nicht zwingend notwendig sind, auch wenn die Oberfläche sich hinsichtlich ihrer

Struktur vom Wildtyp unterscheidet (Claessen *et al.*, 2003; Elliot *et al.*, 2003). Untersuchungen an Knock-Out-Mutanten der Gene *chpA*, *B*, *D*, *F* und *G* zeigten, dass die drei verbleibenden Gene *chpC*, *E* und *H*, die schon zu einem frühen Zeitpunkt der vegetativen Phase exprimiert werden, einen dem Wildtyp ähnlichen Phänotyp zuließen. Die Mutanten können immer noch einen Proteinmantel aus ChpH aufbauen, der über ChpC in der Zellwand verankert ist. ChpE besitzt nicht die typischen konservierten Cysteinreste und hat wohl nur eine unterstützende Rolle (Di Berardo *et al.*, 2008).

Neben diesen Polypeptiden kann u.A. eine weitere Gruppe von Bausteinen, die Rodline, am Aufbau der Proteinhülle beteiligt sein, jedoch sind diese nicht essenziell (Claessen *et al.*, 2002). So zeigten die Hyphenhüllen von *rdl*-Deletionsmutanten zwar nicht mehr die typische Stäbchenform aus Rodlinen und Chaplinen, sondern die verbleibenden Chapline organisierten sich mehr in Fibrillen, ein Verlust an Funktionalität der Oberfläche war hierdurch jedoch nicht auszumachen (Claessen *et al.*, 2004). Die fehlende Notwendigkeit der Rodline für eine intakte Oberflächenhaut wird zusätzlich dadurch unterstrichen, dass bestimmte Streptomyceten kein Rodlingen besitzen (u.A. Ikeda *et al.*, 2003).

1.3.2 Genetische Regulation der Lufthyphenbildung durch die *bld*-Gene

Dramatischere Ergebnisse zeigten Untersuchungen mit den seit langem bekannten *bld*-Mutanten. Diese können kein Luftmyzel mehr ausbilden und werden entsprechend als „nackte“ (engl.: bald) Mutanten bezeichnet. Ursache für fehlendes Luftmyzel ist ein Mangel an SapB und Chaplinen, deren Bedeutung für die Ausbildung von Lufthyphen damit bestätigt wurde (Chater, 2011). Durch Zugabe des Hydrophobins SC3 aus *Schizophyllum commune*, das mit SapB funktionsgleich ist, konnte die Lufthyphenbildung bei *bld*-Mutanten wieder initiiert werden (Tillotson *et al.*, 1998). *ram*-Mutanten, denen SapB fehlt und die dadurch nicht mehr zur Sporulation befähigt sind, lassen sich mit SC3 ebenfalls reaktivieren (Kodani *et al.*, 2005). Dies zeigt einerseits

die existenzielle Bedeutung von SapB auf und andererseits, dass SC3 die Funktion von SapB und der Chapline in sich zu vereinen scheint.

Bei *S. coelicolor* A3(2) konnten in früheren Studien sechs Gene identifiziert werden, die der Gruppe der *bld*-Gene zugeordnet wurden (*bldA* – D: Merrick, 1976; *bld G*, *H*: Champness, 1988). Heute sind mehr als zwanzig Gene bekannt, deren Deletion einen entsprechenden *bld*-Phänotyp ergeben (gelistet von Elliot *et al.*, 2008). Genauere Untersuchungen der ersten sechs bekannten Gene lieferten Hinweise darauf, dass diese in der Summe eine Kaskade mit distinkten Kontrollpunkten auslösen. Nur das Gen *bldA* nimmt dabei eine Sonderstellung ein, weil es für eine spezielle tRNA codiert. Diese vermittelt die Translation des seltenen UUA-Codons, das für die Aminosäure Leucin codiert. Die anderen Gene *bldB* – *bldD* sowie *bldG* und *bldH* hingegen werden für die Synthese regulatorischer Proteine verwendet (Chater und Chandra, 2006). Dies gab Anlass zu der Vermutung, dass sie als „Entscheidungshilfen“ die Differenzierung steuern (Chater, 2011). Für eine Abhängigkeit der Gene untereinander spricht insbesondere die folgende Beobachtung. Werden verschiedene *bld*-Mutanten, die keine Lufthyphen ausbilden können, auf einer Platte kultiviert, so kommt es offensichtlich zu einer Kreuzstimulation, wodurch am Ende alle Mutanten wieder zum wt-Phänotyp differenzieren, während bei einer Einzelkultivierung keine Mutante dieses Stadium erreicht (Willey *et al.*, 1993). Aufgrund dieser Beobachtungen ordneten Willey *et al.* die Gene in der Reihenfolge [*bldA*, *bldH*] < *bldG* < *bldC* < *bldD* (*bldB* findet hier keinen passenden Platz) hierarchisch an (Willey *et al.*, 1993). So scheint es, als würde jedes Gen für ein extrazelluläres Signal codieren, das wiederum die Transkription des nächsten Regulators initiiert. Diese Hierarchie besagt ebenso, dass eine Mutante mit früher Störung in der Genkaskade von einer Variante mit späterer Gendeletion so stimuliert werden kann, dass sie Defekte überwinden und zum wt-Phänotyp differenzieren kann (Willey *et al.*, 1993).

Zurzeit ist nur das erste Signalmolekül charakterisiert. Dabei handelt es sich um ein Oligopeptid unbekannten Ursprungs, das über einen durch *bldK*-codierten ATP-abhängigen Transporter importiert wird (Nodwell *et al.*, 1996;

Nodwell und Losick, 1998). Für alle anderen Signalmoleküle ist bisher nur bekannt, dass sie an der Auslösung verschiedener physiologischer Prozesse wie dem programmierten Zelltod einzelner Hyphenabschnitte (Migueluez *et al.*, 1999) sowie Veränderungen im Einlagerungs- (Chater *et al.*, 1989) oder Primärstoffwechsel (Viollier *et al.*, 2001) beteiligt sind. Am Ende der Kaskade stehen Effektormoleküle, die die Expression von Chaplin- und Rodlingenen, indirekt aber auch die Produktion von SapB, regulieren (Chater und Chandra, 2006).

1.3.3 Weitere genetische Regulatoren

Ein Schlüsselregulator in der Entwicklung von Streptomyceten ist AdpA (A-factor-dependent protein A), ein durch *adpA*-codiertes Protein, das ursprünglich bei *S. griseus* entdeckt wurde und dessen Gen ortholog zum *bldH*-Gen von *S. coelicolor* A3(2) ist. Während die Transkription des Gens bei *S. griseus* vom hormonähnlichen A-Faktor, einem γ -Butyrolacton, induziert wird, zeigt sich diese Abhängigkeit bei anderen Streptomyceten nicht (Horinouchi, 2007). AdpA ist 405 aa lang und gehört zur AraC/XylS-Familie. Besonderheit der Proteinstruktur sind zwei Helix-Turn-Helix-Bindemotive am C-Terminus für DNA sowie eine nicht-konservierte Domäne am N-Terminus zur Erkennung und Bindung von Effektoren (Gallegos *et al.*, 1997; Tobes und Ramos, 2002). Die Transkription von *adpA* bei *S. griseus* ist durch den Repressor ArpA (A-factor-recognition protein A) unterdrückt. Durch Bindung des A-Faktors an ArpA kommt es zur Dissoziation von Repressor und DNA und damit zur Transkription von *adpA*. Derselbe Effekt konnte bei dem zu ArpA homologen CprB von *S. coelicolor* A3(2) nachgewiesen werden (Onaka und Horinouchi, 1997).

Die Bindung von AdpA an entsprechende Promotoren hat in den meisten Fällen eine aktivierende Wirkung auf die Transkription. Nur in wenigen Fällen ist sie repressiv. AdpA-abhängige Promotoren wurden in bisher jedem sequenzierten Streptomyceten-Genom gefunden (z.B. Ohnishi *et al.*, 2005; Akanuma *et al.*, 2009). Unter den so regulierten Genen befinden sich sowohl

pfadspezifische Gene für die Antibiotika-Synthese als auch für die Lufthyphenbildung, sodass *adpA*-Mutanten in beiden Bereichen beeinträchtigt sind (Nguyen *et al.*, 2003; Takano *et al.*, 2003). Beispiele für entwicklungsbestimmende Gene, welche durch AdpA reguliert werden, sind *adsA*, das für einen Sigma-Faktor codiert (Yamazaki *et al.*, 2000), oder auch *amfR*, dessen Produkt als Transkriptionsregulator wiederum das *amfTSBA*-Operon aktiviert, das für die Produktion von SapB-homologen AmfS-Peptiden codiert (Yamazaki *et al.*, 2004). Außerdem stehen Komponenten einer extrazellulären Protease-Kaskade unter AdpA-Kontrolle, die für die weitere Differenzierung wichtig ist (Akanuma *et al.*, 2009).

Das Regulatorgen *adpA* von *S. griseus* und dessen homologe Varianten im Genom anderer Streptomycceten weisen alle das seltene Leucin-Codon UUA auf, was eine direkte Abhängigkeit von der durch *bldA*-codierten UUA-tRNA bewirkt. Dies ist der Grund, warum sich *adpA*- und *bldA*-Mutanten im Zusammenspiel mit anderen *bld*-Mutanten gleich verhalten (Willey *et al.*, 1993; Takano *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*, 2003). Chater und Chandra beschreiben, dass die *bldA-adpA*-Verbindung bereits im Genom des frühesten Vorfahren der Streptomycceten vorhanden gewesen sein muss, da sonst eine solche Homologie innerhalb der Stämme nicht zu erklären wäre (Chater und Chandra, 2008). AdpA wirkt autorepressiv auf die Transkription (Kato *et al.*, 2005a), wohingegen *bldA* direkten Einfluss auf die Translation hat. Zusätzlich konnte bei *S. coelicolor* A3(2) nachgewiesen werden, dass eine weitere Kontrolle posttranskriptionell durch RNaseIII besteht, die das entsprechende *adpA*-Transkript hydrolysiert. Durch Deletion des RNaseIII-codierenden Gens überexprimieren viele AdpA-abhängige Gene inklusive intrazellulärer Proteasen, die wiederum das Potential zur Inaktivierung von RNaseIII haben. Xu *et al.* sehen darin einen Regulationskreislauf (Xu *et al.*, 2010).

Neben *adpA/bldH* tragen 2-3% aller Streptomycceten-Gene das seltene TTA-Codon (Li *et al.*, 2007, Chater und Chandra, 2008), wobei der Großteil der Gen-Produkte keine funktionelle Homologie aufweist. Dies deutet darauf hin, dass

diese Gene nachträglich integriert wurden (Chater, 2011). Unter den wenigen konservierten Genen ist ausschließlich *adpA/bldH* funktionell charakterisiert.

Im Zusammenhang mit dieser Arbeit ist besonders interessant, dass bei *S. coelicolor* A3(2) auch die Transkription eines Gens, das für ein Protein der Familie der *Streptomyces*-Subtilisin-Inhibitoren SSI codiert, von AdpA reguliert wird (Kim *et al.*, 2005). Gleiches gilt für die Transkription von Genen für mindestens elf *S. griseus*-Proteasen und -Peptidasen, deren biologische Funktion bisher nicht näher aufgeklärt werden konnte (Kato *et al.*, 2002, 2005b, 2005c; Tomono *et al.*, 2005; Akanuma *et al.*, 2009). Auch bei diesem Stamm steht nachweislich ein Protein der SSI-Familie unter der Kontrolle von AdpA (Hirano *et al.*, 2006; Chater *et al.*, 2010a). Mitglieder dieser Inhibitorfamilie scheinen bereits in einem sehr frühen Entwicklungsstadium synthetisiert zu werden. Bei *wblA*-Mutanten von *S. coelicolor* A3(2), die nicht zur Sporulation befähigt sind, erfolgt eine Überexpression des *ssi*-Gens (Fowler-Goldsworthy *et al.*, 2011). SSI-Deletionsmutanten von *S. albogriseolus* wiesen hingegen eine erhöhte extrazelluläre Proteaseaktivität, verlangsamtes Wachstum sowie verminderte Sporulationsaktivität auf (Taguchi *et al.*, 1995, 1997).

1.3.4 Proteinöse Regulation der Lufthyphenbildung

Untersuchungen an verschiedenen Streptomyceten deuten darauf hin, dass beim Übergang vom vegetativen zum Luftmyzel der programmierte Zelltod bestimmter Bereiche eintritt, um damit die Nährstoffversorgung für das Lufthyphenwachstum zu sichern (Wildermuth, 1970b; Mendez *et al.*, 1985; Kim *et al.*, 1995; Kang und Lee, 1997; Lee, 1998; Miguelez *et al.*, 1999; Nicieza *et al.*, 1999; Fernandez und Sanchez, 2002). Der Bereich direkt unterhalb der Hyphenspitze, der subapikale Stamm, scheint in der Apoptose eine zentrale Rolle zu spielen. Die Autolyse an dieser Stelle wird wahrscheinlich durch extrazelluläre Proteasen verursacht, die kaskadenartig aktiviert werden (Chater, 2011). Aktivierte Proteasen unterliegen wiederum, zumindest teilweise, einer Regulation durch Bindung von Proteinen der SSI-Familie (Taguchi *et al.*, 1993;

Kim und Lee, 1995b, 1995a, 1996; Kim *et al.*, 1998; Kuramoto *et al.*, 1996; Van Mellaert *et al.*, 1998).

SSI oder auch die verwandten *Streptomyces*-Trypsin-Inhibitoren (STI) sind hochkonservierte Dimere mit identischen Untereinheiten von ca. 100 aa (Mitsui *et al.*, 1977; Takeuchi *et al.*, 1991b, 1992). Sie interagieren mit verschiedenen Serinproteasen (Chater *et al.*, 2010b). Gegenwärtig sind zwei Vertreter dieser Familie bekannt, die eine weitere Bindestelle aufweisen, der ScNPI von *S. caespitosus* (*Streptomyces caespitosus* neutral protease inhibitor; Hiraga *et al.*, 2000) sowie der SSTI von *S. mobaraensis* (*Streptomyces*-Subtilisin- und TAMEP-Inhibitor, Schmidt *et al.*, 2008). Beide Proteine wirken gegen verschiedene Arten von Proteasen, jedoch nur spezifisch gegen einzelne Metalloproteasen. Es erscheint aufgrund der Homologie der SSI untereinander jedoch als denkbar, dass auch die anderen Mitglieder doppelköpfige Inhibitoren sind.

Wahrscheinlich bindet eine Seite an relativ allgemeine Proteasetypen, während die andere selektiv an die P-Domäne spezifischer Proteasen bindet (Chater, 2011). Zwei-Hybrid-Analysen deuten darauf hin, dass SSI (P61152) von *S. coelicolor* A3(2) gleichzeitig mit einer putativen neutralen Zink-Metalloprotease (Q9L1F8) sowie einer putativen sekretierten Serin-Protease (Q0K3X9) (Kim *et al.*, 2008) interagiert, während SSI (B1VRG2) von *S. griseus* die zu Q9L1F8 orthologe Metalloendoprotease Griselysin (B1W035) bindet (Hirano *et al.*, 2006). SSTI von *S. mobaraensis* bindet neben Serinproteasen die neutrale Metalloprotease TAMEP, deren experimentell bestimmter N-Terminus wiederum homolog zu Q9L1F8 und B1W035 von *S. coelicolor* A3(2) bzw. *S. griseus* ist (Chater, 2011). Ein ähnliches Regulationsprinzip wurde ebenfalls für *S. hygroskopikus* beschrieben (Ren *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008a, 2008b).

Da die P-Domäne homolog zu einigen eukaryontischen Proteasen ist, die spezielle Aufgaben in Zellzyklus und -entwicklung vollziehen, könnte diese Funktion auch für entsprechende Streptomyceten-Proteasen gelten, die von SSI reguliert werden (Chater, 2011). TAMEP ist die einzige der genannten

Proteasen, der direkt eine Funktion während der Zellentwicklung zugeordnet werden konnte, nämlich die Aktivierung einer intrinsischen TGase von *S. mobaraensis* durch Abspaltung des Pro-Peptids (Zotzel *et al.*, 2003a). Durch ihre Fähigkeit, Proteine irreversibel miteinander zu vernetzen, wird der TGase eine essenzielle Funktion im Aufbau der Hyphenhülle und damit der Zellentwicklung zugedacht. Somit ist TAMEP gegenwärtig das einzige Enzym innerhalb der postulierten Protease-Kaskade mit einer definierten biologischen Funktion (Chater, 2011).

Interessanterweise ist SSTI gleichzeitig ein Substrat der Transglutaminase wie auch ein Inhibitor für ein TGase-aktivierendes Enzym und legt damit einen besonderen Regulationsmechanismus nahe (Schmidt *et al.*, 2008; Chater, 2011). Ein positiver Feedback-Kreislauf könnte entstehen, wenn SSTI durch den enzymatischen Einbau in eine Proteinmembran verankert und TAMEP weitere Transglutaminase für die Proteinvernetzung aktiviert. Ist aus sterischen Gründen keine Selbstassemblierung des SSTI mehr möglich, so verbleibt er monomer und es könnte dadurch eine Verminderung der weiteren Aktivierung der Transglutaminase auftreten (Schmidt *et al.*, 2008). Ein anderes Beispiel für den Einfluss von Proteasen auf die Zelldifferenzierung ist die Aktivierung einer Nuklease bei *S. antibioticus*, die an der Sporulation beteiligt ist, durch eine unbekannte Serinprotease (Nicieza *et al.*, 1999; Fernandez und Sanchez, 2002). Hier ist jedoch weiterhin unklar, ob die Serinprotease Teil der Proteasenkaskade ist.

Auch unterliegt die Inhibition von Proteasen durch SSI einer Regulation. So konnte gezeigt werden, dass durch Einwirken von Carboxypeptidase A auf den SSI von *S. albogriseolus* S-3253 dessen inhibierende Wirkung auf Subtilisin BPN¹ aufgehoben wird (Sakai *et al.*, 1980). Kim *et al.* konnten zusätzlich nachweisen, dass in älteren Kulturen von *S. coelicolor* A3(2) eine Protease (Q54109) auftritt, die spezifisch den stammeigenen SSI hydrolysiert (Kim *et al.*, 2008), wodurch möglicherweise eine Reaktivierung der Zielprotease erreicht wird. Dass in den Genomen anderer Streptomyceten keine orthologen Gene für Proteasen ähnlicher Funktion zu finden sind, lässt darauf schließen, dass die

Inaktivierung stammspezifisch ist, um so eine Kreuzstimulation verschiedener *Streptomyces*-Stämme im selben Habitat zu verhindern (Chater, 2011).

1.4. Aufgabenstellung

Zu Beginn dieser Arbeit waren von den meisten Proteinen, die im Zusammenhang mit der biologischen Funktion von Transglutaminase in Erscheinung getreten waren, nur die N-terminalen Peptide bekannt. Schmidt hatte bereits in ihrer Dissertation ohne Erfolg versucht, mit Hilfe verwandter SSI-Sequenzen das codierende Gen des *Streptomyces*-Subtilisin- und TAMEP-Inhibitor SSTI unter Anwendung molekularbiologischer Methoden aufzuklären. Das N-terminale Peptid des *Streptomyces*-Papaininhibitors SPI zeigte nur Homologie zu einem funktionell unbekannten Protein, während für das Dispaseautolyse-induzierende Protein DAIP keine Vergleichsproteine in den Datenbanken vorhanden waren. Zusätzlich waren von allen drei Proteinen die biologische Funktion und teilweise die Inhibierungs- bzw. Inaktivierungsmechanismen unbekannt.

Ziel dieser Arbeit war die Identifikation der Gene, die für die drei genannten Proteine codieren, sowie die Bestimmung der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz. Basierend auf diesen Daten sowie der gereinigten Wildtyp-Proteine sollte eine weitergehende biochemische Charakterisierung der Wirkmechanismen stattfinden. Ebenso sollten modifizierte Proteine mit *E.coli* produziert werden, mit denen die Bindestellen der Transglutaminase identifiziert werden konnten.

Gegen Ende dieser Arbeit erfolgte durch Finanzierung des Zentrums für Forschung und Entwicklung der Hochschule Darmstadt die vollständige Sequenzierung des Genoms von *S. mobaraensis*. Auf dieser Grundlage sollten neben den genannten Proteinen solche Gene identifiziert werden, die für Proteine codieren, die nachweislich an der Prozessierung der TGase beteiligt sind. Dazu wurden durch entsprechende Annotation vierzig „Scaffolds“ des Genoms auf das Vorhandensein von Genen untersucht, die für die hyphenhüllebildenden Chapline und Rodline codieren. Weiterhin erfolgte auf

Grundlage dieser Daten die strukturelle Charakterisierung der annotierten Proteine unter Anwendung bioinformatischer Methoden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Mikroorganismen

Der Stamm *Streptomyces mobaraensis* (DSM Nr. 40847) wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, bezogen und seitdem über das Anlegen von Dauerkulturen auf GYM-Agar-Platten konserviert.

Die verwendeten Stämme *E. coli* TOP10, *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* C41 (DE3), *E. coli* C43 (DE3), *E. coli* SHuffle® und *E. coli* BL21-CodonPlus® (DE3) RIL wurden von der AG Pfeifer (TU Darmstadt, Mikrobiologie) oder der Zedira GmbH Darmstadt als Kryostocks zur Verfügung gestellt.

Die verwendeten Stämme *Bacillus anthracis* Vollum (ATCC14578), *Staphylococcus aureus* USA300, *Vibrio cholerae* serotype O1 (ATCC14035), *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (ATCC15692) und *Yersinia pestis* NCTC 08775 wurden am Erasmus Medical Centre Rotterdam, NL, in der Abteilung für Medizinische Mikrobiologie und Infektionen bzw. am BSL-3 facility of TNO Defence, Security and Safety Rijswijk, NL, kultiviert.

2.1.2. Verwendete Vektoren

Name	Hersteller	Selektionsmarker	Größe
pBlueskript SK (+)	Stratagene	Ampicillin	3 000 bp
pET-21a (+)	Novagen	Ampicillin	5 443 bp
pET-22b (+)	Novagen	Ampicillin	5 493 bp
pET-28a (+)	Novagen	Kanamycin	5 369 bp
pJOE2702	-	Ampicillin	4 314 bp
pUC57	GenScript	Ampicillin	2 710 bp

2.1.3. Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der biomers.net GmbH, Ulm, in Kartusche gereinigter Form bezogen.

Name	Sequenz
M13for (-20)	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'
M13rev	5'-CAGGAACACAGCTATGAC-3'
pJOE-Seq-For	5'-CATTTTCCTGTCAGTAACGAG-3'
pJOE-Seq-Rev	5'-CTGATTTAATCTGTATCAGGCTG-3'
SPI_For_MitSP_NdeI	5'-GAGACATCCATATGCGTGAATTCAGGC-3'
SPI_For_ohneSP_MscI	5'-GCGGCATGGCCATGGACATTCC-3'
SPI_For_OhneSP_NdeI	5'-ACCGGCCCATATGGACATTCCG-3'
SPI_for_SZ	5'-GATGACSTACTACACSGACAAGGG-3'
SPI_rev_pET28_mit_C-His_PstI	5'-CTTTGTCTGCAGCCGGATCTCAGTGG-3'
SPI_rev_SZ	5'-AGGTCGATGTGSGTSCGG-3'
SPI_rev_XhoI	5'-CGGACGCTCGAGGCGGACG-3'
SPI_rev_XhoI_pET28a	5'-CCCGGCTCGAGTCAGCGGAC-3'
T7_prom_Seq_for	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
T7_term_Seq_rev	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'

2.1.4. Peptide, Enzyme und Proteine

Wenn keine Spezifikationen angegeben sind, war die Proteinkonzentration oder Enzymaktivität nicht bekannt.

Antarktische Phosphatase, 5 U μl^{-1}
 Anti-DIG IgG, Schaf
 Anti-His₆ IgG, Maus
 Anti-Maus IgG IRDye 800CW, Ziege
 Azocasein
*Bam*HI, 10 U μl^{-1}

New England Biolabs, Frankfurt/M
 Roche, Mannheim
 Roche, Mannheim
 LI-COR, Bad Homburg
 Fluka, Neu-Ulm
 Thermo Scientific, Dreieich

BSA-Standardlösung (2 mg ml ⁻¹ in 0.05% NaN ₃)	Uptima Interchim, Montlucon
Collagenase (<i>Clostridium histolyticum</i>)	Sigma, Zwijndrecht, NL
Dispase I (<i>Paenibacillus polymyxa</i>), > 6 U mg ⁻¹	Worthington, Lakewood, NJ (USA)
DNaseI (Rinderpankreas), 5 811.8 U mg ⁻¹	AppliChem, Darmstadt
<i>DpnI</i>	Thermo Scientific, Dreieich
<i>DreamTaq</i> DNA-Polymerase, 5 U µl ⁻¹	Thermo Scientific, Dreieich
<i>EcoRV</i> , 10 U µl ⁻¹	Thermo Scientific, Dreieich
Klenow-Fragment, 10 U µl ⁻¹	Roche, Mannheim
<i>KpnI</i> , 10 U µl ⁻¹	Thermo Scientific, Dreieich
Lysozym (Hühnereiweiß), ~ 20 000 U mg ⁻¹	Carl Roth, Karlsruhe
<i>NdeI</i> , 10 U µl ⁻¹	Thermo Scientific, Dreieich
Papain (<i>Papaya latex</i>), 3 U mg ⁻¹	Sigma, Taufkirchen
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase, 2.5 U µl ⁻¹	Thermo Scientific, Dreieich
H-Ala-pNA	
H-Ala-Pro-pNA x HCl	
H-Ala-Ala-Phe-pNA	
H-Ala-Phe-pNA x HCl	
H-Ala-Ala-Ala-pNA x HCl	
H-Pro-pNA	
p-Nitroanilid-Substrate	Bachem, Heidelberg
H-Val-Leu-Lys-pNA x 2 HCl	
H-Leu-pNA	
H-Phe-pNA	
H-Gly-Pro-pNA x HCl	
H-Gly-Arg-pNA	
H-Gly-Glu-pNA	
Pronase	Serva, Heidelberg
<i>PstI</i> , 10 U µl ⁻¹	Thermo Scientific, Dreieich
RNaseA (Rinderpankreas), 97.5 U mg ⁻¹	AppliChem, Darmstadt
Staphopain B (<i>Staphylococcus aureus</i>)	BioCentrum, Krakow, PL
T4 DNA-Ligase, 1 Weiss-U µl ⁻¹	Thermo Scientific, Dreieich
<i>XhoI</i> , 10 U µl ⁻¹	Thermo Scientific, Dreieich

2.1.5. DNA-/Proteinstandards

GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Thermo Scientific, Dreieich
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	Thermo Scientific, Dreieich
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Dreieich

2.1.6. Chemikalien, Feinchemikalien und Lösungsmittel

Soweit nicht anders angegeben entspricht die Qualität der verwendeten Chemikalien, Feinchemikalien und Lösungsmittel *pro analysis*. Alle Standardchemikalien wurden von VWR, Darmstadt, bezogen und sind hier nicht aufgeführt.

4-(2-Aminoethyl)-Benzensulfonylfluorid	Serva, Heidelberg
Acrylamid, 4K-Lösung (30%), Mix 29:1	AppliChem, Darmstadt
Agar-Agar	Otto Nordwald, Hamburg
Agarose, LE	Biozym, Hess. Oldendorf
Ammoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Benzamidin	Sigma, Taufkirchen
Bicinchoninsäure, Dinatriumsalz	Thermo Scientific, Dreieich
BikKam 1 > 90%	PepScan Presto B.V., Lelystad, NL
BikKam13 > 90%	PepScan Presto B.V., Lelystad, NL
BikKam16 > 90%	PepScan Presto B.V., Lelystad, NL
BikKam19 > 90%	PepScan Presto B.V., Lelystad, NL
Blocking-Reagenz für Southern Blot	Roche, Mannheim
Brain Heart Infusion Medium	Becton Dickinson B.V., Breda, NL
Cetyltrimethylammoniumbromid, ≥ 98%	Roth, Karlsruhe
Columbia Blutagar	Becton Dickinson B.V., Breda, NL
Coomassie Brilliant Blau G250	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blau R250	Sigma, Taufkirchen
CPD-Star	Roche, Mannheim
dNTP-Mix	Thermo Scientific, Dreieich
dNTP-Mix mit Digoxigenin	Roche, Mannheim
Ethidiumbromid	Biomol Feinch., Hamburg
Hefeextrakt, granuliert	Merck, Darmstadt
Hexanukleotide	Roche, Mannheim
IPTG	Roth, Karlsruhe
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Kodak GBX Developer	Sigma, Taufkirchen
Kodak GBX Fixer	Sigma, Taufkirchen

LB nach Lennox	Roth, Karlsruhe
Leupeptin	Sigma, Taufkirchen
L-Glutathion, reduziert, $\geq 98\%$	Sigma, Taufkirchen
Malzextrakt	Merck, Darmstadt
Na-Deoxycholat, $\geq 98\%$	Sigma, Taufkirchen
Na-MOPS	AppliChem, Darmstadt
N-Ethylmaleinimid	Fluka, Neu-Ulm
N-Lauroylsarcosin, Natriumsalz, $\sim 95\%$	Merck, Darmstadt
N ^{α} -Tosyl-L-lysinchloromethylketon Hydrochlorid	Sigma, Taufkirchen
Odyssey-Blocking-Reagenz	LI-COR, Bad Homburg
Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut	AppliChem, Darmstadt
Phenol unter TE	Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid	AppliChem, Darmstadt
Stärke, löslich	Merck, Darmstadt
Tetramethylethyldiamin	Roth, Karlsruhe
Trypton	AppliChem, Darmstadt
X-Gal	VWR, Darmstadt

2.1.7 Aminosäuren für die Festphasensynthese

Fmoc-L-Ala-OH	Iris Biotech, Marktredwitz
Fmoc-L-Asp(tBu)-OH	Iris Biotech, Marktredwitz
Fmoc-Gly-OH	Iris Biotech, Marktredwitz
Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	Iris Biotech, Marktredwitz
Fmoc-L-Phe-OH	Iris Biotech, Marktredwitz
Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	Iris Biotech, Marktredwitz
Fmoc-L-Val-OH	Iris Biotech, Marktredwitz
NovaSyn [®] TGR resin, polymers Harz	Millipore, Schwalbach

2.1.8. Verbrauchsmaterialien und Kits

BCA-Proteinbestimmungskit Uptima	Interchim, Montlucon (F)
Blottingfilter	Whatman, Dassel
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
E.Z.N.A. [®] Plasmid Mini Kit I	Omega Bio-Tek, Norcross, GA (USA)
GenElut PCR Clean-Up Kit	Sigma, Taufkirchen
Pipettenspitzen 10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen 5000 μ l	VWR, Darmstadt

Reaktionsgefäße 0.3 ml, 1.5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen 50 ml (verdunkelt)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Rundfilter Ø 90 mm	Roth, Karlsruhe
Spritzen 5 ml, 10 ml	B. Braun, Melsungen
Sterilfilter 0.22 µm, 0.45 µm	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.9. Geräte

Brutschrank:	UL 50 Invors HT TH30	Memmert, Schwalbach Invors AG, Bottmingen E. Büchler GmbH, Hechingen
Chromatographie:		
Detektor:	Single Path Monitor UV-1	Pharmacia Biotech, Uppsala, SE
Fraktionssammler:	Fraction Collector Frac-920	Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SE
Pumpe:	Peristaltic Pump P-1	Pharmacia Biotech, Uppsala, SE
Säule:	Superformance Grundeinheit	Merck, Darmstadt
DNA-Konzentrationsdet.:	NanoDrop 1000	Peqlab, Erlangen
Elektrophoresekammer:	Mini PROTEAN-III	Biorad, München
Fotometer:	GENESYS 10 UV	Mikrotek, Overath
	Varian 920-LC, analytisch	Agilent Technologies, Böblingen
	Varian 940-LC, präparativ	Agilent Technologies, Böblingen
RP-HPLC:	PrepStar 218, Solvent Delivery Module	Agilent Technologies, Böblingen
	ProStar 325, UV-Vis-Detektor	Agilent Technologies, Böblingen
	ProStar 410, Auto-Sampler	Agilent Technologies, Böblingen
Kulturkolben:	100-2000 ml, Erlenmayer-3-/4-Schikanen-Kolben	Schott, Mainz
LC-MS	Shimadzu LCMS-2020	Shimadzu, Duisburg
PCR:	TGradient Thermocycler 96	Biometra, Göttingen
pH-Elektrode:	BlueLine 14 pH 526	Schott, Mainz Multical WTW, Weilheim
Pipetten:	0.5-10 µl 10-100 µl 100-1 000 µl 1 000-5 000 µl	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallbad:	Sonorex RK 100	Bandelin, Berlin
UV-Crosslink:	UV Stratalinker 1800	Agilent, Waldbronn

UV-Detektion:	The G-Box	MWG, Elbersberg
UV-Tisch:	Keine Typbezeichnung	Bachofer, Reutlingen
Waage:	Analysewaage	Sartorius Research, Göttingen
	Adventure Ohaus	Sartorius Research, Göttingen
Wasseraufbereitung:	Milli-Q Biocel A10	Millipore, Schwalbach
	Umkehrosmoseanlage RiOs 100	Millipore, Schwalbach
Western Blot-/SDS-PAGE-Detektion:	Odyssey SA	LI-COR, Bad Homburg
Western Blot:	Trans-Blot Semi-Dry Transferzelle	BioRad, München
Zellwachstumsdetektion:	Synergy4	BioTek, Bad Friedrichshall
Zentrifuge:	Reagiergefäßzentrifuge (1.5-2 ml) Sigma, Osterode am Harz	

2.1.10. Festphasen für Chromatographie

Chelating Sepharose™ Fast Flow	GE Healthcare, Uppsala, SE
Fractogel EMD TMAE 650 (S)	Merck, Darmstadt
Fractogel EMD SO ₃ ⁻ 650 (S)	Merck, Darmstadt
Phenomenex® Luna® 5 µm C18(2), AXIA gepackt	Phenomenex, Aschaffenburg
Phenomenex® Hypersil® 5 µm BDS C18	Phenomenex, Aschaffenburg
Phenomenex® Jupiter® 5 µm C4	Phenomenex, Aschaffenburg

2.1.11. Sonstiges

Röntgenfilm:	Amersham Hyperfilm™ ECL	VWR, Darmstadt
Southern Blot-Membran:	PALL Life Science Biodyne® A 0.2 µm	VWR, Darmstadt
Western Blot-Membran:	Immobilon®-FL PVDF 0.45 µm	Merck, Darmstadt

2.1.12. Software

Bildverarbeitung:	GIMP 2.6.6
DNA-Konzentrationsbestimmung:	NanoDrop 1000 Operation Software
DNA-Sequenzauswertung	Chromas Lite 2.01
DNA-Visualisierung und -planung:	Serial Cloner 2.5
	GENTle 1.9.4
Proteinvisualisierung:	UCSF Chimera 1.4.1
SDS-PAGE/Western Blot-Visualisierung:	Odyssey SA Application Software 1.1.7

Statistikprogramm: MS Excel 2007
 GraphPad Prism 5
 Textverarbeitung: MS Word 2007

2.2. Mikrobiologische Methoden

2.2.1. Submerskultivierung von *S. mobaraensis*

Reagenzien und Puffer:

GYM-Agar-Medium pH = 7.2	4	g l ⁻¹	D-Glucose
	4	g l ⁻¹	Hefeextrakt
	4	g l ⁻¹	Malzextrakt
	2	g l ⁻¹	CaCO ₃
	15	g l ⁻¹	Agar-Agar
Stärke-Mineralsalz- Medium	10	g l ⁻¹	Stärke
	1	g l ⁻¹	K ₂ HPO ₄
	2	g l ⁻¹	(NH ₄) ₂ SO ₄
	1	g l ⁻¹	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
	1	g l ⁻¹	NaCl
	2	g l ⁻¹	CaCO ₃
Kulturmedium pH = 7.0	20	g	Pepton
	2	g	Hefeextrakt
	10	g	D-Glukose
	1	l	Stärke-Mineralsalz-Medium
Spurenelement- lösung	4 000	mg l ⁻¹	CaCl ₂ x 2 H ₂ O
	1 000	mg l ⁻¹	Fe(III)-citrat x H ₂ O
	200	mg l ⁻¹	MnSO ₄
	100	mg l ⁻¹	ZnCl ₂
	40	mg l ⁻¹	CuSO ₄ x 5 H ₂ O
	30	mg l ⁻¹	CoCl ₂ x 6 H ₂ O
	30	mg l ⁻¹	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O
	60	mg l ⁻¹	Na ₂ B ₄ O ₇

Zur Gewinnung von vegetativem Material wurde *S. mobaraensis* auf einem Glukose-Hefe-Malz-Agarmedium (GYM-Medium) nach Shirling und Gottlieb (1966) angezogen und mindestens 30 d bei 28 °C kultiviert. Für die Herstellung

des Submerskulturmediums wurde das Stärke-Mineralsalz-Medium nach Shirling und Gottlieb (1966) um die angegebenen Komponenten nach Korn-Wendisch & Kutzner (1981) ergänzt und auf pH 7.0 eingestellt.

Zur Submerskultivierung wurden 110 ml Medium in einen 1 l-Dreischikanekolben gegeben und anschließend zur Sterilisation für 20 min bei 121 °C in feuchter Hitze autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde dem Kulturmedium 1 ml über einen 0.22 µm-Filter sterilfiltrierte Spurenelementlösung nach Voelskow (1981) zugegeben, und die Kultur wurde mit einem ca. 1 cm² großen bewachsenem GYM-Agar-Stück beimpft (zur Gewinnung von DAIP durfte die Plattenkultur nicht älter als 14 Tage sein). Die Inkubation erfolgte auf einem Rundschüttler bei 28 °C oder 42 °C (Stresskultur) und 100 rpm im Brutschrank für die Dauer von 24-48 h.

Nach abgeschlossener Kultivierung wurde die Kultur zur Zellernte abgesaugt, und je nach Fragestellung wurden Durchlauf oder Filterkuchen weiter aufgearbeitet.

2.2.2. Platten- und Submerskultivierung von *E. coli*

Reagenzien und Puffer:

LB-Medium Lennox	nach	10	g l ⁻¹	Pepton
		5	g l ⁻¹	Hefeextrakt
		10	g l ⁻¹	NaCl

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte im Rahmen dieser Arbeit auf LB-Agar-Platten oder in Submerskultur. Für beide Methoden wurde 2% (w/v) LB-Medium nach Lennox verwendet, dem für die Plattenkultivierung noch 1.5% (w/v) Agar-Agar zugesetzt wurde. Die Sterilisation erfolgte durch Autoklavieren in feuchter Hitze bei 121 °C für 20 min. Nach dem Abkühlen wurde zur Selektion transformierter Zellen ein entsprechendes Antibiotikum zugesetzt, wobei das Gießen der Platten noch im warmen Zustand erfolgte, da Agar-Agar unterhalb von ca. 50 °C geliert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit Hilfe eines Drigalski-Spatels ausgestrichen. Das Animpfen der Submerskulturen erfolgte bei Verwendung einer Einzelkolonie mithilfe eines sterilen Zahnstochers und bei

Verwendung eines Cryostocks bzw. einer Vorkultur mit einer Pipette. Die Inkubation von Plattenkulturen erfolgte bei 37 °C ü.N., von Submerskulturen je nach Verwendungszweck unterschiedlich lang auf einem Rundschüttler bei gleicher Temperatur. Für die Proteinproduktion wurden 50 ml einer ü.N.-Vorkultur hergestellt, die entweder zur Herstellung von Cryostocks nach 2.2.3 genutzt wurden, oder zum Animpfen einer Hauptkultur dienten. Das Animpfen der Hauptkultur erfolgte mit der Menge an Vorkultur, dass die OD₆₀₀ zu Beginn der Kultivierung 0.02 betrug. Nach Weiterkultivierung bei 37 °C und Erreichen einer OD₆₀₀ von 0.6 bis 0.8 erfolgte die Induktion der Zielproteinsynthese durch Zugabe von steril filtriertem IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM.

2.2.3. Anlegen von *E. coli*-Cryostocks

Die Langzeitaufbewahrung von *E. coli*-Submerskulturen erfolgte als Glycerin-Cryostock. Hierzu wurden 800 µl Submerskultur mit 200 µl sterilem Glycerin gemischt und bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.4. Wachstumsinhibition von *E. coli* unter dem Einfluss von Proteaseinhibitoren

Um den antibakteriellen Einfluss proteinöser Proteaseinhibitoren auf den Wirtsorganismus zu prüfen, wurde das Wachstum von *E. coli* bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen von SPI und DAIP untersucht. Zu Testzwecken wurde ein mit dem Plasmid pBK AcKRS-3 (Neumann *et al.*, 2009), transformierter *E. coli* BL21 (DE3) pLysS-Stamm genutzt, der von der AG Meyer-Almes zur Verfügung gestellt wurde. Dieser Stamm wurde auch zur heterogenen Expression des SPI-Gens verwendet. Die Untersuchungen bezüglich der Wachstumsinhibition erfolgten nach Tab. 2.

Tab. 2: Methode zur Bestimmung der Wirkung proteinöser Proteaseinhibitoren auf das Wachstum von *E. coli* BL21 (DE3)

Regenerieren von 50 µl chemisch kompetenter Zellen nach 2.3.12
Animpfen von 5 ml LB _{Kan} -Vorkultur mit 20 µl Zellsuspension, Inkubation auf einem Rundschüttler bei 37 °C ü.N.
Animpfen von 5 ml LB _{Kan} -Medium mit 100 µl Vorkultur, Inkubation auf einem Rundschüttler bei 37 °C für 2 h
Überführen von 100 µl Hauptkultur in die Kavitäten einer 96 well Mikrotiterplatte, Versetzen mit 100 µl 20, 10, 5 und 0 µM SPI bzw. DAIP in 50 mM Tris-Acetat, pH 6
Inkubation in Synergy4-Mikrotiterplattenreader der Firma Biotek für 12.5 h bei 37 °C und 1020 rpm
Automatische Aufnahme der OD ₆₀₀ alle 30 min

2.2.5. Wachstumsinhibition pathogener Bakterien unter Einfluss von SPI

Die Arbeiten wurden wegen der Pathogenität der Bakterien am Erasmus Medical Centre Rotterdam in der Abteilung für Medizinische Mikrobiologie und Infektionen durchgeführt.

Zur Bestimmung der antibakteriellen Aktivität von SPI gegen *Bacillus anthracis* Vollum (ATCC14578), *Staphylococcus aureus* USA300, *Vibrio cholerae* serotype O1 (ATCC14035), *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (ATCC15692) und *Yersinia pestis* NCTC 08775 erfolgte nach Tab. 3.

Tab. 3: Wachstumsinhibition pathogener Bakterien unter Einfluss von SPI

Inkubation von 5 ml Brain Heart Infusion-Medium (BHI) bei 35 °C ü.N.
Entnahme von 100 µl, verdünnen mit 5 ml BHI
Inkubation für 2 h bei 35 °C und 200 rpm
Versetzen von 100 µl mit 100 µl 5-20 µM SPI (in BHI) bzw. 50 mM Acetat, pH 4
Inkubation bei 35 °C und 200 rpm
Automatische Aufnahme der OD ₆₀₀ alle 30 min für 12 h mittels BioScreen

2.2.6. Nähere Bestimmung der antibakteriellen Eigenschaften von SPI

Zur Bestimmung, ob SPI bakteriostatische oder bakterizide Eigenschaften aufweist, wurden die nach 2.2.5 erstellten Submerskulturen (10 µM SPI) auf Columbio Blutagar ausgestrichen und bei 35 °C für 72 h inkubiert.

2.2.7. Bestimmung der Zytotoxizität von SPI auf Säugerzellen

Die Bestimmung der Zytotoxizität von SPI auf Säugerzellen erfolgt mittels Lactatdehydrogenase-Assay (LDH-Assay) an der Mäusemakrophagen-ähnlichen RAW264.7-Zelllinie am Erasmus Medical Centre Rotterdam in der Abteilung für Medizinische Mikrobiologie und Infektionen nach Herstellerangaben nach Tab. 4.

Tab. 4: Bestimmung der Zytotoxizität von SPI auf Säugerzellen nach Herstellerangaben

Zellen für 2 h mit 0-10 µM SPI bzw. Kulturmedium (Negativkontrolle) oder 1% Triton-X100 (Positivkontrolle) bei 37 °C und 5% CO ₂ inkubieren
100 µl zellfreien Überstand mit 100 µl frischer LDH-Reaktionslösung versetzen
Inkubation über 30 min bei RT
Bestimmung der A ₄₉₀

Die Zytotoxizität berechnet sich mittels folgender Gleichung:

$$\text{Zytotoxizität} = \frac{A_{490(\text{Probe})} - A_{490(\text{Negativkontrolle})}}{A_{490(\text{Positivkontrolle})} - A_{490(\text{Negativkontrolle})}}$$

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1. Isolierung genomischer DNA aus *S. mobaraensis*

Reagenzien und Puffer:

STE-Puffer	300	mM	Saccharose
pH = 8.0	2.5	mM	Na ₂ EDTA
	25	mM	Tris-HCl
TE-Puffer	10	mM	Tris-HCl
pH = 8.0	1	mM	Na ₂ EDTA
NaCl-Lösung 1	5	mM	NaCl
NaCl-Lösung 2	0.7	mM	NaCl
CTAB-Lösung	10	% (w/v)	Cetyltrimethylammoniumbromid in NaCl-Lösung 2
NaOAc-Lösung	3	M	Natriumacetat
SDS-Lösung	10	% (w/v)	Natriumdodecylsulfat
PCI-Lösung	25:24:1	(v/v/v)	Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol
CI-Lösung	24:1	(v/v)	Chloroform:Isoamylalkohol
Lysozym-Lösung	20	mg ml ⁻¹	Lysozym in STE
Pronase-Lösung	20	mg ml ⁻¹	Pronase
RNase A-Lösung	9.1	mg ml ⁻¹	RNase A

Die Aufklärung der proteincodierenden Gene erfolgte durch die Erstellung einer partiellen Genbibliothek sowie über Polymerasekettenreaktion (PCR). Als Matrix hierzu diente genomische DNA von *S. mobaraensis*, die zuvor nach Tripathi und Rawal (1998) aus feuchter Zellmasse isoliert wurde.

Nach der Kultivierung von *S. mobaraensis* nach 2.2.1 bei 28 °C wurde die Zellmasse durch Absaugen geerntet und mehrfach durch Digerieren mit STE-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Isolation nach Tab. 5 im Rahmen einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (PCI-Extraktion).

Tab. 5: Isolierung genomischer DNA aus *S. mobaraensis* nach Tripathi und Rawal (1998)

Komponenten	Isolationsansatz
Zellfeuchtmasse	1 g
STE-Puffer	8.55 ml
Resuspendieren	
Lysozym-Lösung	950 µl
Inkubation 30 min, 30 °C	
SDS-Lösung	500 µl
Pronase-Lösung	50 µl
Inkubation 60 min, 37 °C	
NaCl-Lösung 1	1.8 ml
Sanft untermischen	
CTAB-Lösung	1.5 ml
Sanft untermischen, Inkubation 20 min, 65 °C	
PCI-Lösung	1 Vol
Zentrifugation für 10 min bei 12.000 x g und RT	
Abnahme der wässrigen Phase und Überführung in neues Gefäß	
PCI-Lösung	1 Vol
Zentrifugation für 10 min bei 12.000 x g und RT	
Abnahme der wässrigen Phase und Überführung in neues Gefäß	
CI-Lösung	1 Vol
Zentrifugation für 10 min bei 12.000 x g und RT	
Isopropanol	0.6 Vol
Präzipitation, 1-24 h, 4 °C und/oder Zentrifugation für 10 min bei 12.000 x g und 4 °C	
TE-Puffer	2 ml
Präzipitat resuspendieren, ggf. auf 50 °C erwärmen	
RNase A-Lösung	11 µl

Tab. 5: Isolierung genomischer DNA aus *S. mobaraensis* nach Tripathi und Rawal (1998) (Fortsetzung)

Inkubation 2 h, 37 °C	
PCI-Lösung	1 Vol
Zentrifugation für 10 min bei 12.000 x g und RT	
Abnahme der wässrigen Phase und Überführung in neues Gefäß	
PCI-Lösung	1 Vol
Zentrifugation für 10 min bei 12.000 x g und RT	
Abnahme der wässrigen Phase und Überführung in neues Gefäß	
CI-Lösung	1 Vol
Zentrifugation für 10 min bei 12.000 x g und RT	
Isopropanol	0.6 Vol
Präzipitation, 1-24 h, 4 °C und/oder Zentrifugation für 10 min bei 12.000 x g und 4 °C	
TE-Puffer	250 µl
Präzipitat resuspendieren, ggf. auf 50 °C erwärmen	

Entscheidend für den Erhalt intakter DNA war, dass nach dem Aufschluss zur Vermeidung von Fragmentierung die labile Zellmasse keinen hohen Scherkräften, beispielsweise durch Vortexen, ausgesetzt wurde. Ebenso musste darauf geachtet werden, dass zur Vermeidung eines CTAB-Niederschlags die Temperatur bis mindestens nach der ersten PCI-Extraktion dauerhaft über 15 °C lag. Die PCI- und CI-Lösungen wurden entsprechend frühzeitig auf RT äquilibriert.

Käufliche RNase A kann mit DNase verunreinigt sein. Zur Inaktivierung von DNase wurde eine 10 mg ml⁻¹ RNase A-Lösung in 0.01 M NaOAc pH 5.2 für 15 min auf 100 °C im Wasserbad erhitzt. Anschließend wurde die Lösung im heißen Wasserbad nach dem Abschalten langsam auf RT gekühlt und dann mit 0.1 Vol Tris-HCl pH 7.4 neutralisiert. Nach dem Aliquotieren in 20 µl-Portionen erfolgte die Lagerung des Enzyms bei -20 °C.

2.3.2. Restriktion von DNA

Durch Inkubation mit Restriktionsendonukleasen können DNA-Stränge jeder Form und Größe selektiv hydrolysiert werden. Hierbei wird die DNA abhängig von Menge und gewählter Nuklease eine angepasste Dauer bei einer enzymespezifischen Temperatur inkubiert. Anschließend erfolgt die Inaktivierung des Enzyms und ggf. die Aufreinigung der DNA durch qualitative Gelelektrophorese nach 2.3.7 oder mittels GenElute™ PCR Clean-Up Kit der Firma Sigma-Aldrich nach 2.3.6. Abschließend konnten die Fragmente im Rahmen einer Ligation weiter verarbeitet werden.

Die Restriktion wurde nach Angaben des Enzymherstellers durchgeführt (Tab. 6).

Tab. 6: Standardpipettierschema zur enzymatischen Hydrolyse von DNA nach Angaben des Herstellers

Zu hydrolysierende DNA mit entsprechender Menge Enzym, 1/10 des Gesamtvolumens enzymespezifischer 10fach Reaktionspuffer, mit sterilem Wasser auf max. 50 µl ergänzen, gut mischen
Inkubation je nach DNA-Menge für bis zu 16 h bei enzymespezifischer Temperatur
Abtrennung des Enzyms durch Hitzeinaktivierung oder Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.3.7)

2.3.3. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Nach der enzymatischen Hydrolyse von DNA findet sich am 5'-Ende des DNA-Strangs eine Phosphat- und am 3'-Ende eine Hydroxylgruppe. Um eine Rezyklisierung der geöffneten Plasmid-DNA zu verhindern, wurde diese vor ihrer Verwendung in einer Ligation dephosphoryliert.

Die Dephosphorylierung des Plasmidfragments erfolgte im Rahmen dieser Arbeit mit Antarctic Phosphatase der Firma New England Biolabs in Anlehnung an das Standardprotokoll des Herstellers, wobei die Inkubationszeit von 15 min auf 30 min verlängert wurde. Der Vorgang wurde zusätzlich wiederholt, um eine vollständige Dephosphorylierung zu erreichen (Tab. 7).

Tab. 7: Standardpipettierschema für die Dephosphorylierung hydrolysierter DNA-Fragmente

Restriktionsendonukleasen nach der Hydrolyse der DNA-Proben inaktivieren bzw. DNA mittels Gelelektrophorese abtrennen
Versetzen der Probe mit 1/10 des Gesamtvolumens 10fach <i>Antarctic Phosphatase</i> -Reaktionspuffer
Vortemperieren der Probe auf 37 °C
Zugabe von 1 µl <i>Antarctic Phosphatase</i> (5 U µl ⁻¹)
Inkubation für 30 min bei 37 °C
Erneute Zugabe von 1 µl <i>Antarctic Phosphatase</i> (5 U µl ⁻¹)
Inkubation für 30 min bei 37 °C
Inaktivierung des Enzyms durch Inkubation für 10 min bei 65 °C
Probe auf Eis abkühlen

2.3.4. Ligation

Die Ligation dient der enzymatischen Verknüpfung von DNA-Fragmenten. Hierbei werden zwei oder mehr Fragmente, die vorher entweder mit demselben Restriktionsenzym oder einem Isocaudomer behandelt wurden, kovalent miteinander verbunden.

Um einen kleinstmöglichen Anteil an Religanden, also hydrolysierter Vektor-DNA mit seinem ursprünglichen Fragment, zu erhalten, wurde diese vor der Ligation nach 2.3.3 dephosphoryliert. Die Menge an eingesetzter Insert-DNA richtete sich nach der Menge an Vektor-DNA sowie nach dem gewünschten Insert-Vektor-Verhältnis. Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgt nach Angaben des Enzymherstellers (Tab. 8). Das Verhältnis von Insert- zu Vektor-DNA berechnet sich wie folgt:

$$\text{Menge Insert [ng]} = \frac{\text{Menge Vektor [ng]} \times \text{Länge Insert [bp]}}{\text{Länge Vektor [bp]}} \times \text{Verhältnis} \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}}$$

Tab. 8: Standardpipettierschema für die Ligation von Vektor- und Insert-DNA nach Herstellerangaben

100-200 ng Vektor- und entsprechende Menge Insert-DNA, 1 µl 10fach T4 Ligase-Reaktionspuffer sowie steriles Wasser in einem Gesamtvolumen von 10 µl mischen
Inkubation für 30 min bei RT bis ü.N. bei 4-16 °C
Einsatz von 1-2 µl für die Transformation

2.3.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode, mit der bereits niedrigste Mengen DNA vervielfältigt werden können. So kann sie einerseits für die Produktion von gewünschten DNA-Fragmenten und andererseits als qualitative Nachweismethode auf das Vorhandensein gesuchter Segmente genutzt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit kamen verschiedene Varianten der PCR zum Einsatz:

- Standard-PCR zum Vervielfältigen von gewünschten DNA-Bereichen (Template: genomische DNA, Plasmid-DNA, lineare DNA)
- Nested-PCR als Aufreinigungsmethode für eine vorhergehende unselektive PCR (Template: Durch vorangegangene Standard-PCR erzeugte Amplifikate)
- Mutagenese-PCR zur Erzeugung von Punktmutationen innerhalb der Sequenz (Template: Plasmid-DNA, lineare DNA)
- Kolonie-PCR als schnelle Nachweismethode auf das Vorhandensein bestimmter DNA-Stücke in transformierten Zellen (Template: *E. coli*-Einzelkolonie)

Alle PCR-Varianten beruhen auf demselben Standardpipettierschema, welches in Tab. 9 dargestellt ist. Die Unterschiede ergaben sich je nach Anwendung nur in der Art des Templates und des Volumens.

Tab. 9: Standardpipettierschema für eine Polymerasekettenreaktion

Substanz	finale Menge	
Vorwärtsprimer	0.4	mM
Rückwärtsprimer	0.4	mM
10fach Pfu-Reaktionspuffer ohne Mg ²⁺	2-5	µl
dNTP-Mix	2.5	mM
Pfu-Polymerase	1	U
Template-DNA	5-20	ng
	oder	
	1	Kolonie
MgSO ₄	1-4	mM
Steriles MilliQ-Wasser	ad 20-50	µl

2.3.6. Reinigung und Konzentrierung von DNA mit GenElute™ PCR Clean-Up Kit

Reinigung von DNA ist dann notwendig, wenn z.B. bei einer vorhergehenden Restriktion eine Nuklease verwendet wurde, die nicht durch Hitze inaktiviert werden kann. Um eine weitere Degradation zu verhindern, muss das Enzym abgetrennt werden. Ein weiteres Anwendungsgebiet der Technik ist die Aufkonzentrierung von Proben, die mittels PCR erzeugt wurden.

Das in dieser Arbeit verwendete GenElute™ PCR Clean-Up Kit der Firma Sigma-Aldrich basiert auf einer Affinitätschromatographie der DNA an Silica-Material und wurde analog Tab. 10 durchgeführt. Die Bestandteile des Kits und deren genaue Zusammensetzung sind Firmengeheimnis.

Tab. 10: DNA-Reinigung oder -Konzentrierung mit GenElute™ PCR Clean-Up Kit nach Herstellerangaben

Zusammensetzen von Säule und Auffanggefäß
Aufgeben von 0.5 ml <i>Column Preparation Solution</i> auf die Säule, Zentrifugation für 1 min bei 12 000 x g und RT, Verwerfen des Durchlaufs

Tab. 10: DNA-Reinigung oder -Konzentrierung mit GenElute™ PCR Clean-Up Kit nach Herstellerangaben (Fortsetzung)

Mischen von 1 Vol DNA-Probe mit 5 Vol <i>Binding Solution</i> , Aufgeben der Lösung auf die Säule und Zentrifugation für 1 min bei maximaler Drehgeschwindigkeit und RT, Verwerfen des Durchlaufs
Aufgabe von 0.5 ml verdünnter <i>Wash Solution</i> auf die Säule und Zentrifugation für 1 min bei maximaler Drehgeschwindigkeit und RT, Verwerfen des Durchlaufs
Zentrifugation der leeren Säule für 2 min bei maximaler Drehgeschwindigkeit und RT
Überführen der Säule in neues Auffanggefäß
Aufgabe von 30 µl steriles, auf ca. 50 °C vortemperiertes Wasser, Inkubation für 1 min und Elution mittels Zentrifugation für 1 min bei maximaler Drehgeschwindigkeit und RT
Wiederholen des vorhergehenden Schritts mit 20 µl

2.3.7. Qualitative Agarose-Gelelektrophorese

Reagenzien und Puffer:

50fach TAE-Puffer	50	mM	Na ₂ EDTA
pH = 8.5	1	M	Essigsäure 99-100%
	2	M	Tris
	10	mM	Tris-HCl
6fach DNA-Auftragspuffer	60	mM	Na ₂ EDTA
pH = 7.6	0.03	% (w/v)	Bromphenolblau
	60	% (v/v)	Glycerin
Ethidiumbromid-Lösung	0.002	% (w/v)	Ethidiumbromid

Zu analytischen Zwecken von DNA-Proben diente die Agarose-Gelelektrophorese, in deren Verlauf die Fragmente anhand ihrer Größe getrennt wurden. Standardgemäß kamen Gele mit einem Agaroseanteil von 1.5% (w/v) zum Einsatz. Bei Gelen, die für eine Southern Blot-Analyse nach 2.3.10 vorgesehen waren, betrug der Agaroseanteil 0.7% (w/v). Die Größe der DNA-Fragmente sowie - semiquantitativ - die Konzentration der aufgetragenen Probe wurde anschließend anhand des Größenstandards GeneRuler™ DNA Ladder Mix der Firma Fermentas (Abb. 6) abgeschätzt.

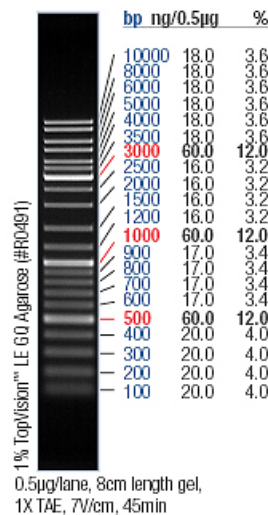


Abb. 6: DNA-Größenstandard GeneRuler™ DNA Ladder-Mix der Firma Fermentas

Zur Herstellung der Gele wurde eine Suspension der entsprechenden Menge Agarose in 1fach TAE-Puffer in einer Mikrowelle aufgekocht. Nach anschließendem Abkühlen auf ca. 50 °C wurde die Lösung in eine zuvor abgedichtete horizontale Gelelektrophorese-Apparatur mit den Maßen 140 x 140 x 5 mm bzw. 105 x 95 x 5 mm gegossen, noch flüssig mit einem Kamm, der die benötigte Anzahl von Zinken enthielt, versehen und nach dem Erstarren mit 1fach TAE-Puffer überschichtet.

Die zu trennenden DNA-Proben wurden mit 1/5 Vol 6fach DNA-Auftragspuffer versetzt, gut durchmischt und, abhängig von der Fragestellung, in einer Menge von 5-50 µl in die Taschen appliziert. Die elektrophoretische Trennung der DNA erfolgte bei einer konstanten Spannung von 40-150 V über einen Zeitraum von 1-16 h. Anschließend wurde das Gel für eine Dauer von 10 min mit Ethidiumbromid gefärbt und 5 min im Wasserbad gewaschen. Die bei einer Wellenlänge von 254 nm fluoreszierenden DNA-Banden wurden photographisch dokumentiert.

2.3.8. Präparative Agarose-Gelelektrophorese

Reagenzien und Puffer:

PCI-Lösung	25:24:1	(v/v/v)	Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol
CI-Lösung	24:1	(v/v)	Chloroform:Isoamylalkohol

NaOAc-Lösung	3	M	NaOAc
TE-Puffer	10	mM	Tris-HCl
pH = 8.0	1	mM	Na ₂ EDTA

Für die präparative Agarose-Gelelektrophorese kamen Gele mit einem Agaroseanteil von 1.5% (w/v) zum Einsatz. Herstellung, Probenvorbereitung und Abschätzung der DNA-Fragmentgröße erfolgte analog 2.3.7. Durch Verbindung einzelner Kammzinken mit Klebeband wurden die Standardgeltaschen für größere Volumina erweitert. Praktischerweise wurden diese so angeordnet, dass auf eine große immer mehrere kleine Taschen folgten, damit ausreichend Platz für die saubere Trennung von Probe- und Musterspuren verfügbar war.

Die Taschen wurden so befüllt, dass in die kleineren jeweils ein Volumen von ca. 10 µl der Probelösung und die restliche Lösung vollständig in die große Tasche injiziert wurde. Zusätzlich enthielt eine kleine Tasche 6 µl GeneRuler™ DNA-Ladder-Mix. Die Trennung erfolgte bei einer Spannung von 150 V.

Nach Beendigung der elektrophoretischen Trennung wurde mit Hilfe eines Skalpell die Probe- von der Vergleichsspur einschließlich Größenstandard getrennt. Nur die Musterspur wurde gefärbt und dokumentiert. Anschließend wurde auf einem UV-Tisch der Firma Bachofer die gewünschte, bei 254 nm fluoreszierende DNA-Bande ausgeschnitten und die UV-Lampe ausgeschaltet. Erst dann wurde die Probe- an die Musterspur angelegt, da es bei eingeschalteter UV-Strahlung zu DNA-Strangbrüchen kommen kann. Das Gelsegment der Probespur auf Höhe des Musters wurde anschließend ausgeschnitten und in ein 2 ml-Reagiergefäß übergeführt. Die Isolierung der DNA aus dem Agarosegel erfolgte durch Phenol-Chloroform-Extraktion nach Tab. 11.

Tab. 11: Pipettierschema für die Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Mechanische Zerkleinerung des Gelfragments
Versetzen mit 1 Vol Phenol, gut vortexen und schockfrieren in flüssigem Stickstoff

Tab. 11: Pipettierschema für die Extraktion von DNA aus Agarosegelen (Fortsetzung)

Zentrifugation für 15 min bei 13 000 x g und RT
Überführen der wässrigen Phase in neues Reaktionsgefäß, Verwerfen der organischen Phase
Versetzen der wässrigen Phase mit 1 Vol PCI, gut vortexten
Zentrifugation für 5 min bei 13 000 x g und 4 °C
Überführen der wässrigen Phase in neues Reaktionsgefäß, Verwerfen der organischen Phase
Versetzen der wässrigen Phase mit 1 Vol CI, gut vortexten
Zentrifugation für 3 min bei 13 000 x g und 4 °C
Überführen der wässrigen Phase in neues Reaktionsgefäß, Verwerfen der organischen Phase
Versetzen der wässrigen Phase mit 1.25 Vol Isopropanol und 0.1 Vol 3 M NaOAc, pH 5.3, gut vortexten
Präzipitation der DNA bei -20 °C für mindestens 1 h, besser ü.N.
Zentrifugation für 30 min bei 13 000 x g und 4 °C, Verwerfen des Überstands
Waschen des DNA-Pellets mit 500 µl 70% kaltem Ethanol
Zentrifugation für 30 min bei 13 000 x g und 4 °C, Verwerfen des Überstands
Pellet lufttrocknen bis kein Ethanolgeruch mehr feststellbar ist
Resuspendieren der DNA in kleinem Volumen H ₂ O oder TE-Puffer, ggf. auf 50 °C temperieren

2.3.9. Markierung von DNA mit Digoxigenin (DIG)

Reagenzien und Puffer:

	2	µl	Hexanukleotide (0.2 µg µl ⁻¹)
Klenow-Mix	2	µl	dNTP-Mix mit DIG (1 mM dATP, dCTP, dGTP; 0.65 mM dTTP; 0.35 mM DIG-dUTP)
	1	µl	Klenow-Fragment (10 U µl ⁻¹)
	5	µl	Steriles MilliQ-Wasser

TE-Puffer	10	mM	Tris-HCl
pH = 8.0	1	mM	Na ₂ EDTA

Die Herstellung einer selektiven DNA-Sonde für die Southern Blot-Analyse geschieht durch statistischen Einbau DIG-markierter Desoxynukleotide in den Gegenstrang eines DNA-Templates mittels des Klenow-Fragments. Hierbei wird die Eigenschaft des Enzyms ausgenutzt, 5'-überstehende DNA-Einzelstränge mit dNTPs aufzufüllen (Polymerasefunktion), wohingegen 3'-überstehende DNA-Einzelstränge abgebaut werden (Exonukleasefunktion). Durch die Inkubation von Template-DNA mit statistisch verteilten Hexanukleotiden (random primer) wird eine Matrix erzeugt, die vom Enzym erkannt und aufgefüllt wird. Das Resultat ist ein mit DIG-markierten Nukleotiden versehenes, zur Template-DNA gegensträngiges Fragment, welches im Zuge der Southern Blot-Analyse selektiv mit den gesuchten Abschnitten hybridisiert und anschließend mittels Anti-DIG IgG markiert und detektiert wird. Die Herstellung der Sonde erfolgte nach Tab. 12.

Tab. 12: Pipettierschema für die Herstellung einer DIG-markierten DNA-Sonde mit Klenow-Fragment

10 µl Template-DNA (ca. 25 ng) für 1-2 min bei 100 °C denaturieren und anschließend in Eiswasser abschrecken
Zugabe des Klenow-Mix, Inkubation bei 37 °C ü.N.
Reaktionsabbruch durch Zugabe von 2 µl 0.25 M Na ₂ EDTA
Fällen der Sonde durch Zugabe von 2.5 µl 4 M LiCl, 75 µl Ethanol (absolut) und Inkubation bei -20 °C ü.N.
Pelletieren durch Zentrifugation für 15 min bei 13 000 x g und 4 °C
Waschen des Pellets mit wenig 70% (v/v) Ethanol (kalt)
Zentrifugation für 15 min bei 13 000 x g und 4 °C
Lufttrocknen des Pellets
Resuspendieren des Pellets in 100 µl TE-Puffer für 30 min bei 37 °C

2.3.10. Southern Blot-Analyse

Reagenzien und Puffer:

Depurinierungs-Lösung	0.25	M	HCl
Denaturierungs-Lösung	1.5	M	NaCl
	0.5	M	NaOH
Neutralisierungs-lösung	1.5	M	NaCl
pH = 7.5	0.5	M	Tris-HCl
20fach SSC-Puffer	3	M	NaCl
pH = 7.0	0.3	M	Na ₃ Citrat
	100	ml	100% Formamid
	50	ml	20fach SSC-Puffer
Hybridisierungs-lösung	40	ml	10% (w/v) Blocking-Reagenz
	0.66	ml	30% (w/v) Lauroylsarcosin
	0.4	ml	10% (w/v) SDS
	9	ml	MilliQ-Wasser
DIG-Sonde	50	µl	Sondenansatz in 50 ml Hybridisierungs-lösung
Stringenz-Lösung 1	0.1	% (w/v)	SDS in 2fach SSC-Puffer
Stringenz-Lösung 2	0.1	% (w/v)	SDS in 0.2fach SSC-Puffer
Puffer 1	0.1	M	Maleinsäure
pH = 7.5	0.15	M	NaCl
Waschpuffer	0.3	% (v/v)	Tween20 in Puffer 1
Puffer 2	1	% (w/v)	Blocking-Reagenz in Puffer 1
Antikörper	5	µl	polyklonaler Anti-DIG IgG aus Schaf in Puffer 1
	5	% (w/v)	SDS
Detection Solution A	25	mM	NaCl
pH = 7.2	17	mM	Na ₂ HPO ₄
	8	mM	NaH ₂ PO ₄

Detection Solution C pH = 9.5	10	mM	Tris-HCl
	10	mM	NaCl
	1	mM	MgCl ₂
100fach CPD- <i>Star</i>	25	mM	Na ₂ C ₁₈ H ₁₉ Cl ₂ O ₇ P
CPD-Puffer pH = 9.5	0.1	M	Tris-HCl
	0.1	M	NaCl
Entwicklerlösung	200	ml	Kodak [®] GBX Developer
	700	ml	H ₂ O
Stopplösung	2	% (v/v)	Essigsäure
Fixierlösung	100	ml	Kodak [®] GBX Fixer
	900	ml	H ₂ O

Die Southern Blot-Analyse dient dem spezifischen Nachweis von DNA innerhalb eines komplexen Gemisches, wie z.B. nach 2.3.2 hydrolysierten genomischer DNA oder auch dem Genom selbst.

Nach der elektrophoretischen Trennung wird DNA noch im Agarosegel mit verdünnter HCl partiell depuriniert, mit verdünnter NaOH denaturiert und der pH mit Tris-HCl-Puffer wieder neutralisiert. Erst dann folgt die Übertragung auf eine Nylonmembran durch Kapillar-Plot (Abb. 7), die Hybridisierung der DNA mit der Sonde und abschließend die Detektion der gesuchten Bereiche auf einem Röntgenfilm. Das vollständige Southern Blot-Protokoll ist in Tab. 13 beschrieben.

Tab. 13: Arbeitsprotokoll zum selektiven Nachweis von DNA durch Southern Blot-Analyse

25 µg genomische DNA von <i>S. mobaraensis</i> statistisch hydrolysieren
Nach der Elektrophorese das Agarosegel (0.7% w/v) 10 min in Depurinierungslösung schwenken
Gel kurz in MilliQ-Wasser waschen
Gel 30 min in Denaturierungslösung schwenken
Gel kurz in MilliQ-Wasser waschen
Gel 30 min in Neutralisierungslösung schwenken

Tab. 13: Arbeitsprotokoll zum selektiven Nachweis von DNA durch Southern Blot-Analyse (Fortsetzung)

Vor dem Blotten die Membran und alle Filterpapiere gut wässern, Membran anschließend 10 min in 20fach SSC einlegen
Kapillar-Blot ü.N. (Aufbau siehe Abb. 7)
Nach dem Blotten Membran vernetzen (UV-Crosslink: 2x 1 min à 120 mJ)
Membran 5 min in MilliQ-Wasser schwenken, blasenfrei in Plastiktasche einschweißen und mit 50 ml Hybridisierungslösung 2 h bei 42 °C inkubieren
Wenn DIG-Sonde frisch, 10 min bei 90 °C denaturieren und anschließend auf Eis abkühlen
Wenn DIG-Sonde frisch, 50 µl Lösung in Tasche einfüllen (Sonden-Lösung kann mehrfach verwendet werden), Inkubation bei 42 °C ü.N.
Zweimaliges Waschen der Membran auf Querschüttler mit Stringenz-Lösung 1 für je 15 min bei RT
Zweimaliges Waschen der Membran auf Querschüttler mit Stringenz-Lösung 2 für je 15 min bei 60 °C im Wasserbad
Waschen der Membran auf Querschüttler mit Waschpuffer für 3 min bei RT
Blocken der Membran auf Querschüttler mit Puffer 2 für 30 min bei RT
Inkubation der Membran auf Querschüttler mit Antikörper für 30 min bei RT
Waschen der Membran auf Querschüttler mit <i>Detection Solution A</i> für 30 min bei RT
Zweimaliges Waschen der Membran auf Querschüttler mit <i>Detection Solution A</i> für 30 min bei RT
Inkubation der Membran auf Querschüttler mit 1fach CPD in CPD-Puffer für 5 min bei RT
Membran kurz auf Filterpapier trocknen
Röntgenfilm auflegen und Inkubation für 30 min bei RT
Film in Entwicklerlösung legen und ca. 2 min inkubieren
Gut mit Wasser abspülen
Film in Stopplösung legen und ca. 2 min inkubieren
Gut mit Wasser abspülen
Film in Fixierlösung legen
Gut mit Wasser abspülen und an der Luft trocknen

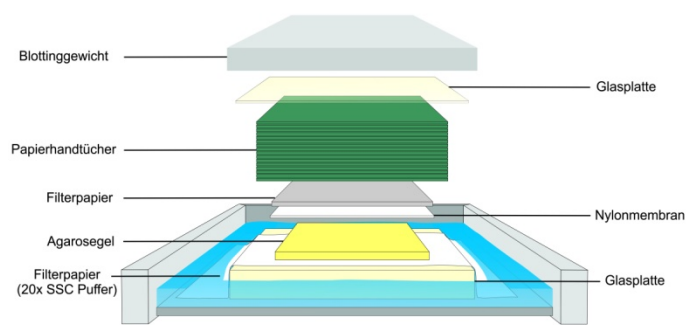


Abb. 7: Schematischer Aufbau des Kapillar-Blots für die Southern Blot-Analyse (graphische Darstellung: L. Henkes)

2.3.11. Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen über CaCl_2 -Methode (Inoue *et al.*, 1990)

Reagenzien und Puffer:

TYM	20	g l^{-1}	Trypton
	5	g l^{-1}	Hefeextrakt
	100	mM	NaCl
	10	mM	MgSO_4
TfB1 pH = 5.8	30	mM	KOAc
	100	mM	KCl
	10	mM	CaCl_2
	50	mM	MnCl_2
	15	% (w/v)	Glycerin
TfB2 pH = 7.0	10	mM	Na-MOPS
	75	mM	CaCl_2
	10	mM	KCl
	15	% (w/v)	Glycerin

Um prokaryontische Zellen kompetent für die Aufnahme von Donor-DNA zu machen, wurde die CaCl_2 -Methode in Anlehnung an das Protokoll von Inoue (1990) angewandt. Ihr zugrunde liegt die Beobachtung, dass durch einen Überschuss an bivalenten Ca^{2+} -Ionen die Durchlässigkeit der Zellmembran für die Aufnahme von DNA erhöht wird. Der genaue Mechanismus ist jedoch bisher nicht bekannt. Zudem sorgen Ca^{2+} -Ionen dafür, dass die negativen Ladungen der Zelloberfläche abgeschirmt werden und dadurch erst eine Annäherung des

ebenfalls negativen, mit Ca^{2+} beladenen Phosphatrückgrats der DNA ermöglichen.

Vor Beginn der Arbeiten musste darauf geachtet werden, dass sämtliche Verbrauchsmaterialien, Bechergläser, Zentrifugenbecher etc. autoklaviert waren, ebenso sämtliche genutzten Puffer und Medien. Bei der Herstellung von TfB1 wurde jedoch das oxidationsempfindliche Mangan-(II)-chlorid erst nach dem Autoklavieren durch einen $0.2\ \mu\text{m}$ -Sterilfilter zugegeben. Ebenso entscheidend für ein erfolgreiches Experiment war, dass die Flüssigkultur eine OD_{600} zwischen 0.5 und 0.6 aufwies und die Zellmasse während der Arbeiten auf Eis gekühlt und nur sanft durch vorsichtiges Aufziehen und Ablassen in einer Pipette resuspendiert wurde, um starke Scherkräfte zu vermeiden und die labile Zellmasse nicht zu zerstören. Die Durchführung erfolgte nach Tab. 14.

Tab. 14: Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen mit CaCl_2 (Inoue *et al.*, 1990)

Kultivierung einer 5 ml-Vorkultur, 37 °C, ü.N.
Überführung der Vorkultur in 250 ml TYM-Medium und Kultivierung bis OD_{600} von 0.5-0.6
Zentrifugation bei 4 °C, 15 min, 4 200 x g
Pellet in 50 ml kaltem TfB1 resuspendieren
Zentrifugation bei 4 °C, 15 min, 4 200 x g
Pellet in 15 ml kaltem TfB2 auf Eis resuspendieren
Aliquotieren
Schockfrieren in flüssigem Stickstoff
Aufbewahrung bei -80 °C

2.3.12. Hitzeschock-Retransformation

Reagenzien:

	5	g l ⁻¹	Hefeextrakt
	20	g l ⁻¹	Pepton
	10	mM	NaCl
SOC-Medium	2.5	mM	KCl
	20	mM	Glucose
	10	mM	MgSO ₄
	10	mM	MgCl ₂

Für die Vervielfältigung von Plasmid-DNA in kompetenten, prokaryontischen Zellen kam die Hitzeschock-Retransformation nach Froger und Hall (2007) zum Einsatz, wobei es sich um eine nicht-virale Insertion von DNA in Wirtszellen handelt. Im Verlauf einer Präinkubation der kompetenten Zellen mit der DNA auf Eis lagern sich die DNA-Moleküle auf der Zelloberfläche ab. Durch einen kurzzeitigen Hitzeschock öffnen sich auf der Oberfläche Poren, durch die die DNA in die Zelle eindringen kann. Durch erneutes Abkühlen auf Eis schließen sich die Poren wieder und die Transformation ist erfolgt. Zur Regeneration der Zellen und Ausbildung der zur Selektion transformierter Zellen erforderlichen Antibiotikumsresistenz wurde der Transformationsansatz mit 250 µl lauwarmen SOC-Medium versetzt und für 60 min bei 37 °C im Thermoblock bei 1 100 rpm inkubiert. Abschließend erfolgte die Ausplattierung von 20 µl und 50 µl auf einer mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzten LB-Agar-Platte und Inkubation bei 37 °C ü.N. Zur Kontrolle wurde immer dieselbe Menge Wasser oder Puffer, in dem die Plasmid-DNA gelöst war, transformiert, um ggf. eine Kontamination des Lösungsmittels erkennen. Die Durchführung der Transformation erfolgte nach Tab. 15.

Tab. 15: Hitzeschock-Retransformation von chemisch-kompetenten *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA in Anlehnung an Froger und Hall (2007)

Kompetente Zellen auf Eis auftauen lassen
1-2 µl Plasmid-DNA-Lösung bzw. Wasser/Puffer an den unteren Rand eines 1.5 ml-Reaktionsgefäßes pipettieren

Tab. 15: Hitzeschock-Retransformation von chemisch-kompetenten *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA in Anlehnung an Froger und Hall (2007) (Fortsetzung)

50 µl kompetente Zellen vorsichtig auf den Plasmid-Tropfen geben
Inkubation für 30 min auf Eis
Hitzeschock für 30 sek bei einer Temperatur von 42 °C
Zellen auf Eis abkühlen lassen
Zugabe von 250 µl lauwarmen SOC-Medium
Regeneration der Zellen für 60 min bei 37 °C und 1 100 rpm
Ausplattieren von 20 µl und 50 µl auf LB-Agar-Platte
Inkubation bei 37 °C ü.N.

Zur Berechnung der Transformations-Effizienz diene folgende Gleichung:

$$\frac{\text{cfu}}{\mu\text{g DNA}} = \frac{\text{Anzahl der Kolonien (cfu)} \times \text{Gesamtvolumen } (\mu\text{l})}{\text{Ausplattiertes Volumen } (\mu\text{l}) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \mu\text{g DNA}}$$

mit cfu = Colony forming units

2.3.13. Hitzeschock-Transformation

Die Hitzeschock-Transformation diene, wie die Retransformation, der nicht-viralen Insertion von DNA in prokaryontische Wirtszellen mit dem Unterschied, dass hier Vektor- und keine plasmidische DNA in die Zellen eingeführt wurde. Der theoretische Hintergrund, die verwendeten Reagenzien und der praktische Ablauf beider Methoden sind gleich, jedoch erfolgt die Regeneration der Zellen nur über einen Zeitraum von 50 min. Das ausplattierte Volumen an Zellsuspension betrug in einem ersten Schritt 50 µl. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation der restlichen 250 µl für 3 min bei 10 000 x g und RT. Nach Abschluss der Zentrifugation wurden 100 µl des Überstands entnommen, die restlichen 150 µl verworfen und das Pellet in den soeben entnommenen 100 µl resuspendiert. Abschließend erfolgte eine zweite Ausplattierung von 50 µl und eine Inkubation bei 37 °C ü.N.

2.3.14. Plasmidpräparation aus *E. coli*-Zellen mit E.Z.N.A.[®] Plasmid Miniprep Kit I

Für die einfache und schnelle Präparation der Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen sind zahlreiche Kits im Fachhandel verfügbar. Das in dieser Arbeit verwendete E.Z.N.A.[®] Plasmid Miniprep Kit I der Firma Omega basiert auf einer Kombination aus basischer SDS-Zellyse und Affinitätschromatographie, wobei das Säulenmaterial sowie die exakten Zusammensetzungen der Puffer und Reagenzien Firmengeheimnis sind. Die Präparation erfolgte nach Tab. 16 analog des Standardprotokolls des Herstellers.

Tab. 16: Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen

Kultivierung einer Einzelkolonie in 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum auf einem Querschüttler bei 37 °C ü.N.
Präzipitieren der Zellmasse durch Zentrifugation für 1 min bei 10 000 x g und RT, Überstand verwerfen
Resuspendierung des Pellets in 250 µl <i>Solution I/RNase A</i> durch Vortexen
Zugabe von 250 µl <i>Solution II</i> , vorsichtiges Mischen durch Invertieren bis ein klares Zelllysate entsteht (2 – 5 min)
Zugabe von 350 µl <i>Solution III</i> gefolgt von sofortigem mehrmaligem Invertieren, um eine lokale Präzipitation zu verhindern
Zentrifugation für 10 min bei $\geq 13\,000 \times g$ und RT
Aufgabe von 100 µl <i>Equilibration Buffer</i> auf die Säule und Zentrifugation in einem 2 ml-Reaktionsgefäß für 1 min bei $\geq 13\,000 \times g$ und RT
Aufgabe des Lyse-Überstands auf die Säule und Zentrifugation für 1 min bei $\geq 13\,000 \times g$ und RT, Durchfluss verwerfen
Aufgabe von 500 µl <i>Buffer HB</i> auf die Säule und Zentrifugation für 1 min bei $\geq 13\,000 \times g$ und RT, Durchfluss verwerfen
Zweimaliges Waschen der Säule mit je 700 µl Waschpuffer und Zentrifugation für 1 min bei $\geq 13\,000 \times g$ und RT, Durchfluss verwerfen
Entfernung des Ethanol durch Zentrifugation für 2 min bei $\geq 13\,000 \times g$ und RT, Durchfluss verwerfen
Lufttrocknen der Säule bis kein Ethanolgeruch mehr feststellbar ist
Elution der DNA mit 50 µl <i>Elution buffer</i> , TE-Puffer oder H ₂ O durch Zentrifugation für 1 min bei $\geq 13\,000 \times g$ und RT

2.3.15. Konzentrationsbestimmung von DNA-Proben

Die Konzentration und Reinheit von DNA-Proben erfolgte photometrisch am NanoDrop 1000. Hierzu wurde ein 1.5 µl-Tropfen der betreffenden Lösung auf die Glasfaseroptik pipettiert, und das Messprogramm wurde gestartet. Nach Abzug des Lösungsmittelblindwerts wurde vom System automatisch anhand der A_{260} die Konzentration der Probe bestimmt. Ebenfalls bestimmt wurde die A_{280} . Mit dem Quotient A_{260} zu A_{280} wurde die Reinheit der Probe abgeschätzt.

2.3.16. Sequenzierung von DNA

Sämtliche DNA-Sequenzierungen von Plasmid- oder mittels PCR erzeugter DNA wurden vom Sequenzierungsservice der Ludwig-Maximilian-Universität München nach dem Protokoll „Circle, Clean & Run (BigDye v3.1)“ durchgeführt. Hierzu wurde eine dem Protokoll entnommene Menge DNA mit 3.2 pmol Sequenzierprimer in 10 mM Tris-HCl, pH 8.5 oder H₂O in einem Gesamtvolumen von 7 µl versetzt und dem Sequenzierservice zur Verfügung gestellt.

Die 454-*De Novo* Sequenzierung des *S. mobaraensis*-Genoms wurde durch die Firma LGC Genomics Berlin durchgeführt. Dabei konnte eine Gesamtzahl von 40 Scaffolds mit Größen von 2.0 kb bis 3.0 Mb erreicht werden, die der Größe nach von Groß nach Klein nummeriert wurden. Mittels lokalem Datenbankabgleich (tBLASTn) wurden die in Tab. 17 angegebenen Genlokalisationen ermittelt.

Tab. 17: Lokalisation der gesuchten Gene auf dem Genom von *S. mobaraensis*: Angegeben sind die Gene sowie deren Lage auf dem Genom. Die Nummerierung der nt-Lokalisation beginnt bei jedem Scaffold bei 1

Gen-Bezeichnung	Scaffold	Strang	nt-Lokalisation
<i>chp1</i>	03	+	104808 - 105713
<i>chp2</i>	02	+	862841 - 863080
<i>chp3</i>	03	+	104416 - 104649

Tab. 17: Lokalisation der gesuchten Gene auf dem Genom von *S. mobaraensis* (Fortsetzung): Angegeben sind die Gene sowie deren Lage auf dem Genom. Die Nummerierung der nt-Lokalisation beginnt bei jedem Scaffold bei 1

<i>Gen-Bezeichnung</i>	<i>Scaffold</i>	<i>Strang</i>	<i>nt-Lokalisation</i>
<i>chp4</i>	08	+	101554 - 101793
<i>chp5</i>	08	+	101992 - 102246
<i>chp6</i>	17	-	40877 - 40638
<i>daip</i>	05	-	284122 - 282998
<i>lsp1</i>	04	+	354035 - 354451
<i>psp-sm</i>	02	+	805326 - 806759
<i>rdl1</i>	01	+	2851362 - 2851772
<i>rdl2</i>	01	+	2851968 - 2852369
<i>rdl3</i>	18	-	23054 - 22659
<i>sip1</i>	01	-	1069914 - 1069123
<i>sip2</i>	01	-	1071208 - 1070123
<i>sip3</i>	01	-	1072001 - 1071387
<i>sip4</i>	01	-	1073165 - 1072478*
<i>sip5</i>	06	+	296908 - 297810
<i>smmpi</i>	01	+	1272771 - 1274327
<i>smmpii</i>	01	+	2130504 - 2132114
<i>spi</i>	06	-	257273 - 256842
<i>ssti</i>	08	-	173148 - 172702
<i>tamep</i>	01	+	1270179 - 1272461
<i>tgase</i>	01	+	763667 - 764890

* = unvollständige Sequenz

2.3.17. Blau-Weiß-Selektion nach R  ther (1980)

Reagenzien:

	10	g l ⁻¹	Trypton
	5	g l ⁻¹	Hefeextrakt
X-Gal-Platten	10	g l ⁻¹	NaCl
	15	g l ⁻¹	Agar
	2	% (v/v)	X-Gal (50 mM)
	0.4	% (v/v)	IPTG (100 mM)

Im Rahmen von molekularbiologischen Arbeiten kann die Blau-We  -Selektion nach R  ther (1980) zur Vorauswahl von solchen *E. coli*-Transformanten dienen, bei denen die Ligation von Donor- in Plasmid-DNA erfolgreich war. Viele käuflich erwerbbaare Plasmide tragen ein   -Galaktosidase-codierendes Gen (*lacZ*), das als Reporter genutzt werden kann. Im Zentrum des *lacZ*-Gens befindet sich die Multiple Cloning Site (MCS) des Plasmids.

Erfolgt die Kultivierung der transformierten Zellen auf X-Gal-Platten, so hydrolysiert die bei intaktem *lacZ*-Gen exprimierte   -Galaktosidase das im Medium enthaltene 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-  -D-galactopyranosid (X-Gal) zu Galaktose und 5-Brom-4-chlorindoxyl. Dieses wird vom Luftsauerstoff zum blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo oxidiert, welcher die Zellen blau färbt.

Ist eine Restriktion und eine Ligation von Fremd-DNA innerhalb der MCS erfolgt, so ist eine Transkription des codierenden Gens nicht mehr möglich und die Kolonie erscheint weiß. Somit ist eine Selektion hinsichtlich der Zellen möglich, die ein mit Fremd-DNA ligiertes Plasmid tragen.

2.3.18. Codonoptimierung des SPI-Gens

Die Herstellung des bezüglich der von *E. coli* genutzten Nukleotidtripplets optimierten SPI-Gens erfolgte nach dem firmeneigenen OptimumGeneTM-Algorithmus durch die Firma GenScript, New Jersey, USA.

2.4. Biochemische Methoden

2.4.1. Homologe Produktion von SPI und Aufreinigung des Proteins aus der Kulturbrühe

Zur homologen Produktion von SPI in *S. mobaraensis* erfolgte die Submerskultivierung nach 2.2.1 unter Stressbedingungen für 40 h. Nach der Zellernte wurden die thermolabilen Bestandteile der Kulturbrühe durch Inkubation für 60 min bei 80 °C und anschließender Vakuumfiltration abgetrennt. Da das Bakterium im Verlauf der Stresskultivierung im großen Maßstab Oligoglutamate exprimiert, welche eine Adsorption des SPI an ein Kationenaustauschermaterial verhindern (Sarafeddinov *et al.*, 2011), mussten diese vorher mittels Anionenaustauschchromatographie (AIC) nach 2.4.3.2 abgetrennt werden. SPI adsorbierte nicht an das AIC-Material sondern befand sich im Durchlauf, der daher anschließend direkt mittels Kationenaustauschchromatographie (KIC) nach 2.4.3.3 aufgereinigt wurde.

2.4.2. Heterologe Produktion von SPI und Rückfaltung aus Einschlusskörpern

Die heterologe Produktion von SPI erfolgte mit *E. coli* BL21 (DE3) pLysS-Zellen der Firma Promega, welche von der AG Pfeifer bezogen und zuvor mit dem Plasmid pET-22b (+)_SPI_{opt} nach 2.3.12 transformiert worden waren. Die Kultivierung der Zellen erfolgte nach 2.2.3. Da die Proteine im Verlauf der Produktion zu Einschlusskörpern (EK) aggregierten, war es nötig, diese aus den Zellen zu präparieren und anschließend das denaturierte Protein durch Faltung in die aktive Form zu bringen.

2.4.2.1. Präparation von Einschlusskörpern aus *E. coli*

Reagenzien und Puffer:

Tris-Acetat-Puffer pH = 6.0	50	mM	Tris-Acetat
DNase I- Reaktionspuffer pH = 7.4	50 5 0.13	mM mM mM	Tris-HCl MgCl ₂ CaCl ₂
	100	mM	Kaliumphosphat
EK-Waschpuffer pH = 8.0	2 1 10 1	mM M % (v/v) % (w/v)	Na ₂ EDTA Harnstoff Glycerin Na-Deoxycholat
EK-Resuspensions- puffer pH = 8.0	0.1 8 5	M M mM	Tris-HCl Harnstoff DTT

Nach der rekombinanten Proteinexpression in Form von EK müssen diese aus den Zellen isoliert und vor der Rückfaltung resuspendiert werden. Die Präparation beruht auf mehreren Schritten: dem mechanischen Zellaufschluss mittels Ultraschall, dem enzymatischen Abbau von Zellwandproteinen und DNA, mehrfachem Waschen unter leicht denaturierenden Bedingungen und abschließend die Resuspension der unlöslichen Einschlusskörper (EK) unter stark denaturierenden Bedingungen. Die Präparation erfolgte nach Tab. 18.

Tab. 18: Präparation von Einschlusskörpern aus *E. coli*

Ernte der <i>E. coli</i> -Zellen durch Zentrifugation für 15 min bei 17 000 x g und 4 °C
Resuspension des Zellpellets in 10 ml Tris-Acetat-Puffer pro Gramm Zellmasse
Mechanischer Zellaufschluss mit Ultraschallstab (30 sek, 50% Amplitude, 0.5 sek Puls mit 0.5 sek Pause) auf Eis
Pelletieren der Zelltrümmer durch Zentrifugation für 30 min bei 27 000 x g und 4 °C
Resuspendieren des Pellets in 10 ml DNase I-Reaktionspuffer pro Gramm Feuchtmasse
Zugabe von 0.2 mg Lysozym und 250 U DNase I pro Milliliter Reaktionspuffer

Tab. 18: Präparation von Einschlusskörpern aus *E. coli* (Fortsetzung)

Inkubation für 60 min bei 37 °C
Pelletieren mittels Zentrifugation für 10 min bei 12 000 x g und 4 °C
Resuspendieren des Pellets in 10 ml Waschpuffer pro Gramm Feuchtmasse
Zweimaliges Vortexen für 1 min
Pelletieren mittels Zentrifugation für 10 min bei 12 000 x g und 4 °C
Wiederholen des Waschschriffs
Wiederholen des Lysozym-/DNase I-Verdau sowie der Waschschriffs
Resuspendieren des Pellets in 10 ml EK-Resuspensionspuffer pro Gramm Feuchtmasse
Inkubation rollend bei 4 °C ü.N.
Zentrifugation für 15 min bei 27 000 x g und 4 °C
Verwerfen des Pellets

2.4.2.2. Rückfaltung von rekombinant hergestelltem Protein aus Einschlusskörpern

Reagenzien und Puffer:

NaCl-Lösung	6	M	NaCl
Faltungspuffer	50	mM	NaOAc
pH = 4.0	2	mM	Reduziertes Glutathion
	0.2	mM	Oxidiertes Glutathion

Die Bedingungen während der EK-Resuspension führen zu einer vollständigen Denaturierung der Proteine einschließlich der Reduktion bestehender Cystinbrücken. Um eine Renaturierung zu erreichen, werden unterschiedliche Methoden wie Dialyse, Harnstoffgradient im Verlauf einer Chromatographie uvm. zur Harnstoff-Reduzierung angewandt (Fischer *et al.*, 1993). Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Renaturierung durch schlagartiges Verdünnen der Resuspension in Faltungspuffer. Die Verdünnung erniedrigt die Konzentration an Denaturierungsmittel und bewirkt die entropiegetriebene Faltung der im Wasserkäfig vereinzelt Proteine. Über thermodynamisch unterschiedliche Zwischenstufen, die als metastabile Zustände eine große

Beständigkeit haben können, wird die native Konformation erreicht (Abb. 8). Anhand der Hitzestabilität des SPI wurde angenommen, dass mindestens eine Cystinbrücke zur Stabilisierung des Proteins beiträgt. Für die Oxidation der Cysteinseitenketten wurden oxidierte Thiolreagenzien, hier Glutathion, dem Faltungspuffer zugesetzt. Um einerseits eine Verarmung an oxidierender Spezies zu vermeiden und andererseits potentiell falsch-geschlossene Disulfidbrücken wieder zu öffnen, wurde gleichzeitig reduziertes Glutathion zugesetzt. Hierdurch kommt es zu einem Redox-Kreislauf des Glutathions, wodurch immer genügend oxidierte Spezies zur Verfügung steht.

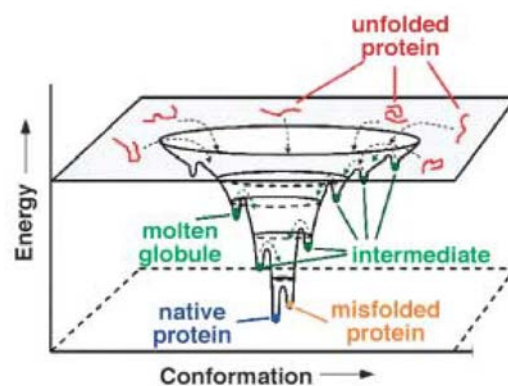


Abb. 8: Faltungstrichter nach Schultz, 2000: Dargestellt ist die Abhängigkeit der freien Energie jeder Proteinstruktur von der Konformation. Jedes Energieminimum stellt eine thermodynamisch (meta-)stabile Form dar.

Vor der Renaturierung wurden DNA-Fragmente, die mit positiv geladenem SPI aggregieren können, entfernt, um Verluste während der DNA-Präzipitation zu vermeiden. Hierzu wurde die Resuspensionslösung mit 6 M NaCl versetzt und gut gemischt. Zusätzlich wurde ein enzymatischer Abbau sowie eine mechanische Degradation der DNA im Ultraschallbad vorgenommen. Erst dann erfolgte eine portionsweise Zugabe der Proteinlösung in den Faltungspuffer.

Nach der Faltung wurde nativer SPI von fehlgefalteten Varianten durch Hitzepräzipitation getrennt. Die abschließende Reinigung und Konzentrierung der Proben erfolgte mittels immobilisierter Metallionenaffinitätschromatographie (IMAC) oder KIC nach 2.4.3.1 bzw. 2.4.3.2. Das vollständige Rückfaltungsprotokoll ist in Tab. 19 dargestellt.

Tab. 19: Rückfaltung denaturierter Proteine aus Einschlusskörpern

Versetzen der Proteinresuspension mit 1/3 Vol 6 M NaCl
Gut mischen
Mechanische Degradation der DNA im Ultraschallbad für 20 min
Portionsweises Einbringen der Resuspension in Faltungspuffer unter Schütteln
Inkubation rollend bei 4 °C ü.N.
Zentrifugation für 15 min bei 17 000 x g und 4 °C
Erhitzen des Überstands für 60 min auf 80 °C
Nach dem Abkühlen Zentrifugation für 15 min bei 17 000 x g und 4 °C
IMAC oder KIC nach 2.4.3.1 bzw 2.4.3.3

2.4.3. Chromatographische Verfahren

Durch chromatographische Verfahren lassen sich Bestandteile einer komplexen Mischung wie z.B. Proteine in einer Kulturbrühe leicht anhand ihrer Wechselwirkungen mit einer stationären Phase trennen.

Je nach Fragestellung wurden im Rahmen dieser Arbeit Proteinlösungen entweder über eine gepackte und äquilibrierte Säule gepumpt, gewaschen und eluiert (Standardverfahren), oder die entsprechend äquilibrierte Festphase wurde direkt der Proteinlösung zugesetzt (Batch-Verfahren). Nach einer angepassten Inkubation wurde dann das Material mittels Zentrifugation abgetrennt, in eine Säule gefüllt, und nach mehreren Waschschritten wurden die Proteine direkt eluiert. Für die Aufreinigung aus Kulturbrühe wurde diese im Vorfeld filtriert, um sie von Schwebstoffen zu befreien. Die Proteinelution wurde dabei jeweils durch kontinuierliche Aufnahme der A_{280} verfolgt.

2.4.3.1. Immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie

Bei der immobilisierten Metallionenaffinitätschromatographie (immobilized metal ion affinity chromatography; IMAC) wird die hohe Affinität eines Oligohistidin-Tags, welcher hier C-terminal an rekombinantem SPI fusioniert wurde, zu Ni^{2+} -Ionen ausgenutzt. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete

Material, Chelating Sepharose Fast Flow, stammte von der Firma GE Healthcare. Die Proteinlösung wurde entweder über äquiliertes Säulenmaterial gepumpt, oder batchweise an voräquiliertes Material bei sanfter Bewegung adsorbiert. Die Elution erfolgte anschließend entweder mit einem linearen Imidazolgradienten oder durch Stoßelution mit entsprechender Menge Imidazol in Puffer. Die Methodenparameter sowie das Verfahren zum Vorbereiten und Beladen des Säulenmaterials und der Ablauf der Chromatographie im Standard- bzw. Batch-Verfahren sind in Tab. 20 und Tab. 21 bzw. Tab. 22 dargestellt.

Tab. 20: Parameter der IMAC im Standardverfahren

Stationäre Phase:	Sepharose Chelating Fast Flow
Durchmesser:	1.0 cm
Betthöhe:	Variabel
Bettvolumen:	Variabel
Mobile Phasen:	50 mM Tris-Acetat, pH 6.0, 40 mM Imidazol 50 mM Acetat, pH 4.0, 40 mM Imidazol
Flussrate:	1 ml min ⁻¹ 2 ml min ⁻¹

Tab. 21: Ablaufschema der IMAC im Standardverfahren

Arbeitsschritt	Lösung	Volumen
Flussrate: 2 ml min ⁻¹		
Spülen	MilliQ-Wasser	20-30 ml
	0.1 M NiCl ₂	20 ml
	MilliQ-Wasser	20 ml
Äquilibrieren	Protein-Puffer	20 ml
Flussrate: 1 ml min ⁻¹		
Probenaufgabe	Protein-Lösung	Variabel
Spülen	Protein-Puffer	30 ml

Tab. 21: Ablaufschema der IMAC im Standardverfahren (Fortsetzung)

Elution	0-1 M linearer Imidazol-Gradient in Protein-Puffer	50 ml
	alternativ 1 M Imidazol in Protein-Puffer für Stoßelution	Variabel
Flussrate: 2 ml min ⁻¹		
Spülen	50 mM Na ₂ EDTA	20 ml
	MilliQ-Wasser	20 ml
	20% (v/v) Ethanol	20 ml

Tab. 22: Ablaufschema der IMAC im Batchverfahren

Säulenmaterial zum Waschen großzügig mit MilliQ-Wasser überschichten, gut mischen
Zentrifugation für 10 min bei 27 000 x g und RT, Verwerfen des Überstands
Zweimaliges Wiederholen des Waschschriffs
Fünffaches Säulenvolumen 100 mM NiCl ₂ -Lösung zugeben, Inkubation rollend für 30 min, RT
Zentrifugation für 10 min bei 27 000 x g und RT, Verwerfen des Überstands
Säulenmaterial zum Waschen großzügig mit MilliQ-Wasser überschichten, gut vortexen
Zentrifugation für 10 min bei 27 000 x g und RT, Verwerfen des Überstands
Zweimaliges Wiederholen des Waschschriffs
Fünffaches Säulenvolumen Protein-Puffer zugeben, Inkubation rollend für 30 min, RT
Zentrifugation für 10 min bei 27 000 x g und RT, Verwerfen des Überstands
Versetzen der Protein-Lösung mit entsprechender Menge Säulenmaterial, Inkubation für eine angepasste Dauer bei RT
Packen einer Säule und weiteres Vorgehen wie in Tab. 21 beschrieben
alternativ
Zentrifugation für 10 min bei 27 000 x g und RT, Verwerfen des Überstands
Waschen des Säulenmaterials durch Resuspension in angepasster Menge Protein-Puffer
Zentrifugation für 10 min bei 27 000 x g und RT, Verwerfen des Überstands

Tab. 22: Ablaufschema der IMAC im Batchverfahren (Fortsetzung)

Wiederholen des Waschschriffs
Stoßelution durch Resuspension in angepasster Menge 1 M Imidazol in Protein-Puffer
Zentrifugation für 10 min bei 27 000 x g und RT
Weiterverwendung des Eluats

2.4.3.2. Anionenaustauschchromatographie

Zur Abtrennung anionischer Komponenten aus *S. mobaraensis*-Kulturbrühe wurde eine Anionenaustauschchromatographie (AIC) an Fractogel EMD TMAE der Firma Merck durchgeführt. Hierzu wurde das Säulenmaterial auf pH 9.0 äquilibriert, danach erfolgte die Auftragung der *via* 0.45 µm-Filter von Schwebstoffen befreiten Probe. Da die AIC hier nur der Abtrennung anionischer Bestandteile der Kulturbrühe diene, wurde der Durchlauf weiter aufgearbeitet. Die adsorbierten Bestandteile wurden verworfen. Die Methodenparameter (Tab. 23) sowie das Verfahren zum Vorbereiten und Beladen des Säulenmaterials und der Ablauf der Chromatographie (Tab. 24) sind nachfolgend dargestellt.

Tab. 23: Parameter der AIC

Stationäre Phase:	Fractogel EMD TMAE 650
Durchmesser:	1.6 cm
Betthöhe:	12.5 cm
Bettvolumen:	30 ml
Mobile Phasen:	50 mM Tris-Acetat, pH 9 (Puffer A)
Flussrate:	1 ml min ⁻¹

Tab. 24: Ablaufschema der AIC

Arbeitsschritt	Puffer A / %	0.2 M NaOH / %	0.02% (w/v) NaN ₃ / %
Äquilibrieren	100	-	-
Probenauftrag	-	-	-
Vorlauf	100	-	-
Regenerierung	-	100	-
Konservierung	-	-	100

2.4.3.3. Kationenaustauschchromatographie

Zur Reinigung von Wildtyp- und rekombinantem SPI aus *S. mobaraensis*-Kulturbrühe oder Rückfaltungspuffer mit solubilisierten Einschlusskörpern von *E. coli* wurde im Rahmen dieser Arbeit die Kationenaustauschchromatographie (KIC) an Fractogel EMD SO₃⁻ der Firma Merck genutzt. Hierbei wurde die Proteinlösung bei pH 4.0 entweder über äquilibriertes Säulenmaterial gepumpt oder batchweise an voräquilibriertes Harz adsorbiert. Die Elution erfolgte dann entweder durch Anlegen eines linearen NaCl-Gradients oder durch Stoßelution mit NaCl in entsprechendem Puffer. Die Methodenparameter sowie das Verfahren zum Vorbereiten und Beladen des Säulenmaterials und der Ablauf der Chromatographie im Standard- bzw. Batchverfahren sind in Tab. 25 und Tab. 26 bzw. Tab. 27 dargestellt.

Tab. 25: Parameter für die KIC im Standard- und Batchverfahren

Stationäre Phase:	Fractogel EMD SO ₃ ⁻
Durchmesser:	1.6 cm
Betthöhe:	12.5 cm
Bettvolumen:	30 ml
Mobile Phasen:	50 mM Acetat, pH 4.0 (Puffer B) 50 mM Acetat, pH 4.0, 1 M NaCl (Puffer C)
Flussrate:	1 ml min ⁻¹

Tab. 26: Ablaufschema für die KIC im Standardverfahren

Arbeitsschritt	Puffer B / %	Puffer C / %	0.2 M NaOH / %	0.02% (w/v) NaN ₃ / %
Äquilibrieren	100	-	-	-
Probenauftrag	-	-	-	-
Vorlauf	100	-	-	-
linearer Gradient	100-0	0-100	-	-
Regenerierung	-	-	100	-
Konservierung	-	-	-	100

Tab. 27: Ablaufschema für die KIC im Batchverfahren

Säulenmaterial zum Waschen großzügig mit MilliQ-Wasser überschichten, gut mischen
Zentrifugation für 10 min bei 27 000 x g und RT, Verwerfen des Überstands
Zweimaliges Wiederholen des Waschschriffs
Fünffaches Säulenvolumen 50 mM Acetat, pH 4.0, zugeben, Inkubation rollend für 30 min, RT
Zentrifugation für 10 min bei 27 000 x g und RT, Verwerfen des Überstands
Zweimaliges Wiederholen der Äquilibrierung
Versetzen der Protein-Lösung mit entsprechender Menge Säulenmaterial, Inkubation für eine angepasste Dauer bei RT
Packen einer Säule und weiteres Vorgehen wie in Tab. 26 beschrieben alternativ
Zentrifugation für 10 min bei 27 000 x g und RT, Verwerfen des Überstands
Waschen des Säulenmaterials durch Resuspension in angepasster Menge Protein-Puffer
Zentrifugation für 10 min bei 27 000 x g und RT, Verwerfen des Überstands
Wiederholen des Waschschriffs
Stoßelution durch Resuspension in angepasster Menge 1 M NaCl in Protein-Puffer
Zentrifugation für 10 min bei 27 000 x g und RT
Weiterverwendung des Eluats

2.4.4. Dialyse

Die Dialyse wird genutzt, um auf schonende Weise das Medium, in dem sich ein Protein befindet, zu wechseln. So lassen sich z.B. Pufferzusammensetzungen oder Additive wie EDTA wechseln, zu- oder abführen. Hierzu wird das Protein in einem entsprechend den Herstellerangaben vorbereiteten Dialyseschlauch gefüllt, der in dem neuen Medium platziert wird, welches im Verlauf der Dialyse mehrfach gewechselt wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die Dialyse Schläuche der Firma Serva mit Ausschlussgrenze von 3 500 Da (SPI) und 12 000-14 000 Da (DAIP) genutzt.

2.4.5. Lyophilisation

Die Lyophilisation diente der Aufkonzentrierung von Proteinproben. Hierzu wurden diese nach der Dialyse nach 2.4.4 bei -20 °C eingefroren. Dann folgte der Gefriertrocknungsprozess bei 0.22 mbar, bei dem das Wasser sublimiert und ein watteähnlicher Rückstand entsteht. Nach Bedarf wurde das getrocknete Protein bei -18 °C gelagert oder in einem Puffer gelöst. Größere Volumina mit bekanntem Proteingehalt nach der Dialyse wurden vor dem Lyophilisieren gleichmäßig auf verschiedene Lagergefäße verteilt.

2.4.6. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Reagenzien und Puffer

Acrylamid-Lösung	29	% (w/v)	Acrylamid
	1	% (w/v)	Bisacrylamid
Tris-Puffer pH = 8.9	1	M	Tris-HCl
Tris-Puffer pH = 6.8	1	M	Tris-HCl
SDS-Lösung	20	% (w/v)	SDS
APDS-Lösung	12	% (w/v)	Ammoniumperoxodisulfat

	100	mM	Tris-HCl
2fach SDS-Auftragspuffer mit	4	% (w/v)	SDS
β -Mercaptoethanol	20	% (v/v)	Glycerin
pH = 6.8	2	% (v/v)	β -Mercaptoethanol
	0.04	% (w/v)	Bromphenolblau
10fach Elektrodenpuffer	0.25	M	Tris-HCl
	1.92	M	Glycin
pH = 8.9	1	% (w/v)	SDS

Anhand einer diskontinuierlichen, eindimensionalen SDS-Gelelektrophorese lässt sich die Zusammensetzung von Proteinmischungen, die Reinheit einer Extraktion oder auch allgemein die Größe von Proteinen abschätzen. Durch Anlegen einer konstanten Spannung an eine durchlässige Matrix, hier vernetztes Polyacrylamid, kommt es zu einer Trennung der Proteine relativ zu ihrer Größe. Um Einflüsse der unterschiedlichen Struktur der jeweiligen Proteine bzw. deren Oberflächenladungen auszuschließen, werden sie vor der Elektrophorese mit SDS-Auftragspuffer versetzt, wodurch es einerseits zur Denaturierung und damit zur Auflösung der Sekundär- und Tertiärstruktur kommt, und andererseits die Oberflächen mit einer gleichmäßigen negativen Ladung versehen werden. Zusätzlich wird zur Reduktion der Cystinbrücken β -Mercaptoethanol im Auftragspuffer mitgeführt, wodurch es ebenfalls zur Denaturierung kommt und gleichzeitig das Auftreten unerwünschter und im Falle dieser Arbeit auch unnatürlicher Proteinoligomere, die über intermolekulare Disulfidbrücken vernetzt sind, ausgeschlossen wird.

Die Herstellungen zweier 12.5% Trenngele sowie zweier 5% Sammelgele sind in Tab. 28 beschrieben. Alle Komponenten des Trenngels wurden in einem Becherglas gemischt und unter Vermeidung von Luftblasen in eine bereits zusammengesetzte Gelgießkassette gegossen. Abschließend erfolgte die Überschichtung mit mindestens 100 μ l Isopropanol zur Erzeugung einer glatten Oberfläche und die Polymerisation für mindestens 45 min bei RT. Nach Beendigung der Polymerisation wurde der Alkohol abdekantiert, die zuvor gemischte Sammelgellösung wurde auf das Trenngel gegossen und sofort mit einem Kamm zur Erzeugung der Probestaschen versehen.

Tab. 28: Herstellung von zwei SDS-Polyacrylamidelektrophoresegelelen nach Lämmli (1970)

Komponente	Trenngel 12.5%	Sammelgel 5%
Acrylamidlösung	5 ml	660 µl
1 M Tris-HCl, pH 8.9	4.5 ml	-
1 M Tris-HCl, pH 6.8	-	500 µl
MilliQ-Wasser	2.2 ml	2.75 ml
SDS-Lösung	60 µl	20 µl
TEMED	10 µl	5 µl
APDS-Lösung	100 µl	50 µl

Nach einer erneuten Polymerisation von mindestens 30 min konnte mit der Elektrophorese begonnen werden. Hierzu wurden die Gelkassetten in eine Elektrophoresekammer Mini PROTEAN III der Firma Bio Rad eingesetzt und mit 1fach Elektrodenpuffer befüllt. Zur Vorbereitung flüssiger Proteinproben wurden diese mit 1 Vol 2fach SDS-Auftragspuffer mit β -Mercaptoethanol versetzt und für 10 min in der Siedehitze inkubiert. Proteinpellets wurden mit 10-50 µl 2fach SDS-Auftragspuffer mit β -Mercaptoethanol überschichtet und ebenfalls für 10 min in der Siedehitze inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 10 000 x g und RT wurden 10-25 µl in die Probentasche gefüllt. Zur Abschätzung der Proteingröße wurde eine Probentasche mit 15 µl PageRuler™ Unstained Protein Ladder der Firma Fermentas (1:5 mit 2fach SDS-Auftragspuffer verdünnt; Abb. 9) versehen. Sollte das Elektrophoresegel im Anschluss mittels Western Blot-Analyse weiter untersucht werden, wurde stattdessen 5 µl PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Abb. 11) eingesetzt. Nach Befüllen aller Taschen wurde die Kammer verschlossen, die Elektrophorese durch Anlegen einer Spannung von 150 V gestartet und dann beendet, wenn Bromthymolblau in etwa das letzte Zehntel des Gels erreicht hatte (ca. 50 min).

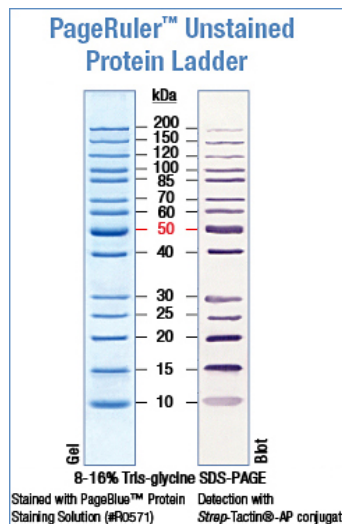


Abb. 9: Protein-Größenstandard PageRuler™ Unstained Protein Ladder der Firma Fermentas

2.4.7. Färben von SDS-Polyacrylamidgelen

Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine für die Dokumentation sichtbar gemacht. Dies erfolgte im Rahmen dieser Arbeit mit Silber-, Coomassie-Brilliantblau- und Immunfärbung.

2.4.7.1. Silber-Färbung nach Blum *et al.*, 1987

Reagenzien und Puffer:

	50	% (v/v)	Ethanol
Fixierlösung	12	% (v/v)	Essigsäure
	38	% (v/v)	MilliQ-Wasser
Waschlösung	50	% (v/v)	Ethanol
	50	% (v/v)	MilliQ-Wasser
Vorbehandlungs- lösung	0.2	g	Na ₂ S ₂ O ₃
	500	ml	MilliQ-Wasser
Imprägnierlösung	0.4	g	AgNO ₃
	100	µl	35% Formaldehyd
	200	ml	MilliQ-Wasser
Entwickler	12	g	Na ₂ CO ₃
	100	µl	35% Formaldehyd
	200	ml	MilliQ-Wasser

Die Silberfärbung beruht auf der Ausbildung eines Protein-Silber-Komplexes, der auf den Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten von Glutamin, Asparagin und Cystein mit Ag^+ -Ionen basiert. Durch das Einwirken von alkalischem Formaldehyd kommt es zu einer Reduktion des Metalls, woraufhin eine Braunfärbung auftritt, die mittels normaler Fotokamera detektiert wird. Die Färbung verläuft nach Tab. 29:

Tab. 29: Anfärben von Polyacrylamidgelen durch Silberfärbung nach Blum *et al.*, 1987

Anfärbeschritt	Lösung	Dauer
Fixieren	Fixierlösung	Mind. 1 h, besser ü.N.
Waschen	Waschlösung	Dreimal je 20 min
Vorbehandeln [*]	Vorbehandlungslösung	1 min ^{**}
Waschen	MilliQ-Wasser	Dreimal kurz
Imprägnieren [*]	Imprägnierlösung	20 min
Waschen	MilliQ-Wasser	Dreimal ^{***}
Entwickeln [*]	Entwicklungslösung	Bis zur gewünschten Intensität
Waschen	MilliQ-Wasser	Zweimal 2 min
Stoppen / Aufbewahren	Fixierlösung	Bis zur Detektion

^{*}: Lösungen frisch ansetzen; ^{**}: Auf gute Benetzung des Gels achten; ^{***}: Schale dreimal zügig mit Wasser befüllen und sofort wieder entleeren

2.4.7.2. Coomassie-Färbung nach Matsudaira, 1987

Reagenzien und Puffer:

	0.5	g	Coomassie G250 in 100 ml MeOH
Färbelösung	0.5	g	Coomassie R250 in 100 ml H ₂ O
	20	ml	Essigsäure
	40	% (v/v)	Methanol
Entfärbelösung	10	% (v/v)	Essigsäure
	50	% (v/v)	MilliQ-Wasser

Die Färbung von Elektrophoresegelele mit Coomassie basiert auf der Adsorption des Farbstoffs an basische Seitenketten eines Proteins. Diese

Färbemethode lässt sich, im Gegensatz zur Silberfärbung, auch zur Quantifizierung von Proteinen einsetzen, ist jedoch weniger sensitiv. Das Färben und Entfärben der Gele kann entweder auf einem Querschüttler oder in der Mikrowelle erfolgen und ist in Tab. 30 beschrieben.

Tab. 30: Anfärben von Polyacrylamidgelen durch Coomassiefärbung nach Matsudaira, 1987

Anfärbeschritt	Querschüttler	Mikrowelle
Färben	30 min mit Coomassie-Färbelösung	5 min bei 130 W mit Coomassie-Färbelösung
Entfärben	30 min mit Entfärbelösung, wiederholen bis zur gewünschten Intensität	5 min bei 240-340 W mit MilliQ-Wasser, wiederholen bis zur gewünschten Intensität
Aufbewahren	MilliQ-Wasser	MilliQ-Wasser

Die abschließende Aufnahme der Proteinbanden erfolgte im Rahmen dieser Arbeit durch Anregung des Farbstoffs bei 685 nm und Detektion des fluoreszierenden Lichts bei 700 nm am Odyssey[®] Sa der Firma LI-COR.

2.4.8. Western Blot-Analyse

Reagenzien und Puffer:

	40	mM	ε-Aminocapronsäure
Kathodenpuffer	0.05	% (w/v)	SDS
	10	% (v/v)	Methanol
Anodenpuffer 1	300	mM	Tris
	10	% (v/v)	Methanol
Anodenpuffer 2	25	mM	Tris
	10	% (v/v)	Methanol
TBS pH = 8.0	10	mM	Tris-HCl
	150	mM	NaCl
	0.05	% (v/v)	Tween20
PBS pH = 7.4	137	mM	NaCl
	2.7	mM	KCl
	12	mM	Phosphat

Odyssey-Blocking-Reagenz

Erstantikörper Anti-His IgG aus Maus

Zweitantikörper IRDye 800CW Anti-(Maus IgG) IgG aus Ziege

Die Western Blot-Analyse dient dem immunchemischen Nachweis von Proteinen. Aufgrund der hohen Selektivität, die durch die Qualität des Erstantikörpers reguliert wird, wird diese Technik speziell zum eindeutigen Nachweis von Proteinen innerhalb eines komplexen Gemischs, wie z.B. einem Zelllysat, genutzt.

Im Anschluss an die elektrophoretische Trennung der Proteine wurden diese durch Elektrodialyse via Semi Dry-Blot aus dem Gel auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran transferiert. Der Aufbau der Blottingapparatur ist in Abb. 10 dargestellt.

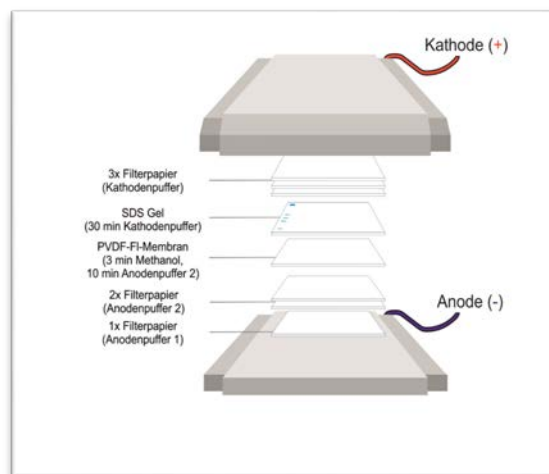


Abb. 10: Schematischer Aufbau des Semi Dry-Blots für die Western Blot-Analyse (graphische Darstellung: L. Henkes)

Nach dem Proteintransfer erfolgte die immunchemische Färbung. Hierbei assoziierte das Zielprotein zuerst mit dem spezifischen Antikörper, der anschließend mit einem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper umgesetzt wurde. Die Bildgebung erfolgte am Odyssey[®] Sa der Firma LI-COR. Durch Anregung mit einem Halbleiterdioden-Laser bei 785 nm kam es zur Fluoreszenz des gebundenen Farbstoffs, deren Intensität bei 800 nm detektiert wurde. Parallel zu den Proteinen wurde ein PageRuler[™] Prestained Plus Protein Ladder-Größenstandard der Firma Fermentas (Abb. 11) zur Abschätzung der

Proteingrößen aus dem Gel auf die Membran transferiert, dessen Fluoreszenz nach Anregung bei 685 nm bei 700 nm detektiert werden konnte, wobei aufgrund der Farbgebung die 25 und 70 kDa-Banden nicht erkennbar waren.

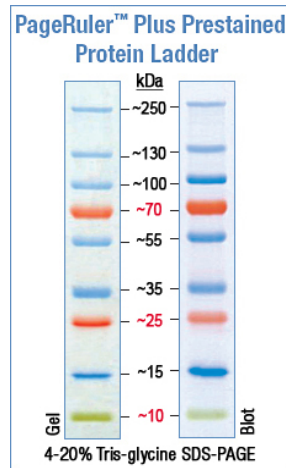


Abb. 11: Protein-Größenstandard PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder der Firma Fermentas

Die Durchführung der Western Blot-Analyse erfolgte nach Tab. 31.

Tab. 31: Durchführen der Western Blot-Analyse

Nach Beendigung einer SDS-PAGE das Sammelgel entfernen
Sechs Filterpapiere sowie die PVDF-Membran auf Gelgröße schneiden. Die Vorbehandlung aller Komponenten sowie der Zusammenbau der Semi Dry-Blotapparatur erfolgt nach Abb. 10
Elektrodialyse bei konstanter Spannung von 20 V für 1.5 h
Überführen der Membran in braunes 50 ml Greiner-Röhrchen
Dreimaliges Waschen der Membran rollend mit 10 ml TBS für 5 min bei RT
Absättigen der Bindestellen durch Inkubation rollend mit 10 ml Odyssey-Blocking-Reagenz für 1 h bei RT
Viermaliges Waschen der Membran rollend mit 10 ml TBS für 5 min bei RT
Inkubation mit dem Erstantikörper rollend für mindestens 1 h, besser ü.N. bei 4 °C
Viermaliges Waschen der Membran rollend mit 10 ml PBS + 0.1% (v/v) Tween20 für 5 min bei RT
Inkubation mit dem Zweitantikörper rollend für 1 h bei RT

Tab. 31: Durchführen der Western Blot-Analyse (Fortsetzung)

Viermaliges Waschen der Membran rollend mit 10 ml PBS + 0.1% (v/v) Tween20 für 5 min bei RT
Mehrmaliges Waschen der Membran rollend mit 10 ml PBS bis Hintergrundsignal bei der Detektion ausreichend reduziert
Kurzzeitiges Trocknen der Membran zwischen Druckerpapier
Dokumentation der Fluoreszenz bei 700 und 800 nm

2.4.9. Bicinchoninsäure-Test

Reagenzien:

	0.50	g	Bicinchoninsäure, Dinatriumsalz
	1.00	g	Na ₂ CO ₃
Reagenz A	0.08	g	Natriumtartrat
pH = 11.25	0.20	g	NaOH
	0.48	g	NaHCO ₃
	50.00	ml	MilliQ-Wasser
Reagenz B	0.40	g	CuSO ₄
	10.00	ml	Milli-Q-Wasser
Eichstandard	0-1000	mg ml ⁻¹	bovines Serumalbumin

Der Bicinchoninsäure-Test (BCA-Test) nach Smith *et al.* (1985) stellt eine einfache photometrische Methode zur Quantifizierung von Proteinen in Lösung dar. Er beruht auf der Reduktion von Cu²⁺ zu Cu⁺ durch verschiedene Aminosäuren und die Peptidbindungen selbst und einer anschließenden Komplexierung des Cu⁺ durch den zweizähligen Liganden Bicinchoninsäure. Hierdurch kommt es zur Ausbildung eines violetten Farbkomplexes, dessen A₅₆₂ anhand einer Sechspunkt-Eichgerade für die Quantifizierung nach Tab. 32 genutzt wird.

Tab. 32: Quantitative Bestimmung von Proteinkonzentrationen durch BCA-Assay nach Smith *et al.*, 1985 (15 Proben)

Reagenzien	Analysenansatz	Reagenzienblindwert
Testlösung aus Reagenz A und B	15 ml Reagenz A und 300 µl Reagenz B	
	1 ml	1 ml
	Inkubation für 10 min bei 37 °C	
Probe/Eichlösung	50 µl	50 µl Milli-Q-Wasser
Inkubation für 30 min bei 37 °C, Überführung in 1 ml-Einwegküvetten, Bestimmung der A_{562}		

2.4.10. Azocasein-Assay zur Bestimmung proteolytischer Aktivität in Anlehnung an Anson (1938)

Reagenzien und Puffer:

Citrat-Puffer pH = 6.5	100	mM	Na ₃ Citrat
Substratlösung	1	% (w/v)	Azocasein in Citrat-Puffer
Proteaselösung	125	µM	Papain in Citrat-Puffer
Inhibitorlösung	0-10	µM	SPI in Citrat-Puffer (teilweise mit 1 M NaCl oder 1 M Imidazol)
Stoppreagenz	10	% (v/v)	Trichloressigsäure

Um unspezifisch die proteolytische Aktivität von Proteasen und damit einhergehend indirekt die inhibitorische Aktivität von Inhibitoren zu bestimmen, wurde ein modifizierter Assay nach Anson (1938) verwendet. Anstelle von Hämoglobin wurde Azocasein eingesetzt, das durch die Protease partiell hydrolysiert wird. Nach Inkubation von Protease (und Inhibitor) mit Azocasein erfolgte der Reaktionsabbruch durch Zugabe von Trichloressigsäure, wodurch länger-kettige Peptide und Proteine präzipitieren. Durch lösliche Peptide wird der Überstand gefärbt, dessen Extinktion bei 420 nm (A_{420}) ein direktes Maß für die proteolytische Aktivität ist.

Die proteolytische Aktivität von Papain sowie die inhibitorische Aktivität von SPI wurden nach Tab. 33 durchgeführt. Die Proteaseaktivität wurde für jede

Messreihe neu bestimmt. Ebenso wurden immer Standardproben von wtSPI innerhalb jeder Messreihe mitgeführt.

Tab. 33: Bestimmung der proteolytischen Aktivität in Anlehnung an Anson (1938)

Lösungen	Inhibitoransatz	Positivkontrolle	Reagenzienblindwert
Enzymlösung	20 µl	20 µl	-
Inhibitorlösung	x µl	-	x µl
Puffer	180-x µl	180 µl	180-x µl
Inkubation für 10 min bei 37 °C			
Substratlösung	200 µl	200 µl	200 µ
Inkubation für 60 min bei 37 °C			
Stoppreagenz	600 µl	600 µl	600 µl
Zentrifugation für 5 min bei 10 000 x g und RT			
Bestimmung der A ₄₂₀			

2.4.11. Inhibition der Aktivität papainähnlicher Proteasen durch SPI

Reagenzien und Puffer:

PBS pH = 7.4	137	mM	NaCl
	2.7	mM	KCl
	12	mM	Phosphat
Substratlösung	16	µM	BikKam1
			BikKam13
			BikKam16
			BikKam19
Proteaselösung	60	µg ml ⁻¹	Staphopain B
	80	µg ml ⁻¹	Collagenase
Inhibitorlösung	0-1000	nM	SPI in PBS

Tab. 34: Substrate zur Bestimmung der inhibitorischen Aktivität papainähnlicher Proteasen durch SPI

Protease	Familie	Substrat	Sequenz	Referenz
Gingipain K (<i>P. gingivalis</i>)	C25	BikKam13	<i>FITC-R_(D)RK-εDbc</i>	Kaman <i>et al.</i> , 2012
Gingipain R1 (<i>P. gingivalis</i>)	C25	BikKam16	<i>FITC-RRK-εDbc</i>	Kaman <i>et al.</i> , 2012
Unbekannt (<i>B. anthracis</i>)	N/A	BikKam1	<i>FITC-L_(D)LK-εDBC</i>	Kaman <i>et al.</i> , 2011
Staphopain B (<i>S. aureus</i>)	C47	BikKam17	<i>FITC-FRK-εDBC</i>	Massimi <i>et al.</i> , 2002
Collagenase (<i>C. histolyticum</i>)	M9	BikKam18	<i>FITC-AAGPAAK-εDBC</i>	Hu <i>et al.</i> , 2002

Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von SPI auf papainähnliche Proteasen erfolgte nach dem von Kaman *et al.* beschriebenen Verfahren (Kaman *et al.*, 2011, 2012). SPI, Peptid mit gelöschter Fluoreszenz (Tab. 34) und filtrierter Kulturbrühenüberstand (0.22 µm) bzw. in PBS gelöstes Enzym wurden im Gesamtvolumen von 50 µl für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die verbleibende proteolytische Aktivität wurde mittels FluoStar Galaxy Spektrometer in 2 min-Intervallen durch Bestimmung der A₅₃₀ verfolgt (Excitation 485 nm). Als Positivkontrolle wurde die Fluoreszenz ohne SPI, als Probenblindwert die Fluoreszenz ohne Substrat bestimmt.

2.4.12 Bestimmung der hydrolytischen Aktivität von Glykosylhydrolasen nach Bernfeld (1955)

Reagenzien und Puffer:

			Dextran
			Saccharose
			Agarose
			Stärke
Substratlösung	1	% (w/v)	Cellulose
			Carboxymethylcellulose
			Chitin
			in 50 mM Acetat, pH 5.0
Enzym-Lösung	21	µM	SPI in 50 mM Acetat, pH 4.0
Tartrat-Lösung	12	g	Kalium-Natrium-Tartrat Tetrahydrat in 8 ml 2 M NaOH
Färbereagenz	96	mM	3,5-Dinitrosalicylsäure

Zur Herstellung der Färbelösung wurden 20 ml 96 mM 3,5-Dinitrosalicylsäure unter Erwärmen auf 50-70 °C und ständigem Rühren gelöst und im Anschluss mit 12 ml 50-70 °C warmen Wasser sowie 8 ml Tartrat-Lösung gemischt.

Die Bestimmung der hydrolytischen Aktivität von Glykosylhydrolasen nach Bernfeld basiert auf der enzymatischen Spaltung polymerer Zucker. Hierdurch nimmt faktisch die Anzahl freier Aldehydfunktionen in Lösung zu, welche im Anschluss 3,5-Dinitrosalicylsäure zu 3-Amino-5-nitrosalicylsäure reduzieren, wodurch ein Farbumschlag auftritt. Dieser wird photometrisch bestimmt und ist ein Maß für die Enzymaktivität (Bernfeld, 1955).

Tab. 35: Bestimmung der hydrolytischen Aktivität von Glykosylhydrolasen nach Bernfeld (1955)

Lösungen	Testansatz	Reagenzienblindwert
Enzymlösung	50 µl	-
50 mM Acetat, pH 4.0	-	50 µl

Tab. 35: Bestimmung der hydrolytischen Aktivität von Glykosylhydrolasen nach Bernfeld (1955) (Fortsetzung)

Substratlösung	500 µl	500 µl
Inkubation für 30 min bei 40 °C		
Färbelösung	1 ml	1 ml
Inkubation für 5 min kochend im Wasserbad		
Schnelles Abkühlen auf RT		
Bestimmung der A_{540}		

2.4.13. Aktivitätstest zur Bestimmung einer Aminopeptidaseaktivität mit *para*-Nitroaniliden

Reagenzien und Puffer:

Proteasepuffer	100	mM	Tris-HCl
pH = 7.5	2	mM	CaCl ₂
Substratlösung	4 000	µM	pNA-Derivat in DMF
DAIP-Lösung	2	µM	DAIP in Proteasepuffer

Die Untersuchungen auf eine Aminopeptidaseaktivität von DAIP erfolgten durch Hydrolyse von Aminosäuren und Peptiden, die C-terminal mit *para*-Nitroanilin derivatisiert waren. Durch Hydrolyse des farblosen Peptidyl-4-nitroanilids wird gelbes *para*-Nitroanilin freigesetzt, das durch Bestimmung der A_{405} quantifiziert wird. Die Zunahme der A_{405} in gegebener Zeit ist dabei direkt proportional zur Enzymaktivität. Die Bestimmung einer Aminopeptidaseaktivität wurde wie in Tab. 36 beschrieben durchgeführt.

Tab. 36: Pipettierschema zur Bestimmung einer Amino-peptidaseaktivität mit *para*-Nitroaniliden

Arbeitsschritt	Reagenzien	Analyseansatz	Reagenzienblindwert
Substrat vorlegen	DMF	150 µl	150 µl
	Substratlösung	50 µl	50 µl
	Proteasepuffer	200 µl	300 µl
Reaktionsstart	Protease (DAIP)-Lösung	100 µl	-
Inkubation	-	45 min bei 37 °C	
Abbruch	Proteasepuffer	500 µl	500 µl
Messung	-	Detektion der A ₄₀₅	

Die Volumenaktivität berechnete sich wie folgt:

$$\text{Volumenaktivität: } \left[\frac{U}{ml} \right] = \frac{\Delta E \times V}{\epsilon \times d \times v \times t}$$

mit	ΔE	Extinktionsdifferenz zwischen Proben- und Blindwert
	V	Gesamtvolumen (1 ml)
	ϵ	molarer Extinktionskoeffizient von p-Nitroanilin in Tris-HCl pH 7.5 (9.962 ml µmol ⁻¹ cm ⁻¹)
	d	Schichtdicke der Küvette (1 cm)
	v	Probenvolumen (0.1 ml)
	t	Reaktionszeit (45 min)

2.4.14. Homologe Produktion von DAIP und Aufreinigung des Proteins aus der Kulturbrühe

Zur homologen Produktion von DAIP in *S. mobaraensis* erfolgte die Submerskultivierung nach 2.2.1 bei 28 °C für 48 h. Nach der Zellernte erfolgte eine erste Reinigung und Konzentrierung des Proteins durch fraktionierende Ethanol-fällung nach 2.4.15. Die abschließende Reinigung erfolgte durch KIC nach 2.4.3.3. des 50-80%-Ethanolpräzipitats. Wenn nötig wurde das KIC-Eluat durch Rechromatographie weiter gereinigt.

2.4.15. Ethanol-Fällung

Protisch dipolare Lösungsmittel wie Ethanol setzen aufgrund ihrer niedrigen Dielektrizitätskonstante im wässrigen Milieu die Löslichkeit von Proteinen herab und können somit zum Ausfällen von Proteinen genutzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Ethanol-Fällung dazu genutzt, DAIP aus der Kulturbrühe von *S. mobaraensis* durch Abtrennung anderer extrazellulärer Proteine vorzureinigen bzw. zu konzentrieren. Um Denaturierungen der Proteine zu vermeiden, wurden alle Fällungen auf Eis und unter langsamen Zutropfen von eiskaltem Ethanol mittels Tropftrichter und mechanischem Rührer durchgeführt.

Für die Isolierung von DAIP wurde das zuvor erhaltene Filtrat bis zu einer Endkonzentration von 50% (v/v) mit Ethanol versetzt und nach 30 min weiterem Rühren bei 10 000 x g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Das so erhaltene Präzipitat wurde verworfen und der Überstand weiter verarbeitet. Der Ethanolgehalt im Überstand wurde anschließend auf 80% (v/v) erhöht und das nach dem darauffolgenden Zentrifugieren erhaltene Präzipitat in 50 mM Acetat pH 4 resuspendiert, direkt weiter verwendet oder bei -20 °C gelagert.

2.5. Analytische und organochemische Verfahren

2.5.1 Umkehrphase-Hochleistungs-Flüssigchromatographie (RP-HPLC)

Die Methode beruht auf der Verteilung eines Analyten zwischen einer mobilen wässrigen Phase und einer stationären hydrophoben Phase. Die HPLC diente im Rahmen dieser Arbeit der Kontrolle des Syntheserfolgs der Peptid-Festphasensynthese sowie der Untersuchung auf potentielle Hydrolyseprodukte. Die hier genutzte HPLC wurde in der AG Kolmar, TU Darmstadt durchgeführt. Als stationäre Phase wurde eine C₁₈-Säule verwendet, die mobile Phase stellte ein Gemisch aus Wasser und 0.1% (v/v) TFA dar. Die

Elution erfolgte mittels linearen Acetonitrilgradienten von 10% (v/v) bis 100% (v/v), die Detektion bei einer Wellenlänge von 220 nm. Die Chromatographieparameter sowie der Ablauf sind nachfolgend dargestellt.

Tab. 37: Parameter der präparativen HPLC zur Peptidreinigung

Stationäre Phase:	Phenomenex® Luna 5 µm C18(2), AXIA gepackt
Säulenabmessung:	250 x 21.20 mm
Partikeldurchmesser:	5 µm
Porengröße:	100 Å
Mobile Phasen:	Milli-Q mit 0.1% (v/v) TFA (Eluent A) Acetonitril mit 0.1% (v/v) TFA (Eluent B)
Flussrate:	1 ml min ⁻¹
Druck:	140 bar

Tab. 38: Parameter der analytischen HPLC zur Überprüfung der Peptidsynthese und Peptidhydrolyse durch DAIP

Stationäre Phase:	Phenomenex® Hypersil 5 µm BDS C18
Säulenabmessung:	150 x 4.6 mm
Partikeldurchmesser:	5 µm
Porengröße:	130 Å
Mobile Phasen:	Milli-Q mit 0.1% (v/v) TFA (Eluent A) Acetonitril mit 0.1% (v/v) TFA (Eluent B)
Flussrate:	1 ml min ⁻¹
Druck:	140 bar

Tab. 39: Ablaufschema der präparativen und analytischen Auftrennungen über RP-HPLC

Arbeitsschritt	Eluent A / %	Eluent B / %	Volumen / ml
Äquilibrieren	90	10	10
Probenauftrag	-	-	0.05-0.1
linearer Gradient	90-0	10-100	25
Regenerierung	0-90	100-10	10

2.5.2. Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Die Bestimmung der Molmassen der Eluenten nach der Flüssigchromatographie erfolgte im Rahmen dieser Arbeit durch ESI-MS. Dabei handelt es sich um eine schonende Ionisationsmethode, bei der keine Molekülfragmente erwartet werden. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte LC-ESI-MS am LCMS-2020 der Firma Shimadzu erfolgte in der AG Kolmar, TU Darmstadt. Nach der Auftrennung mittels vorgeschalteter RP-LC-Säule über linearen Acetonitrilgradienten von 10% (v/v) bis 100% (v/v) wurden die Analyten mittels ESI ionisiert und anschließend über ein Oktapol nach ihrem m/z-Verhältnis getrennt. Die zugrunde liegenden Parameter sowie der Ablauf sind in Tab. 40 und Tab. 41 dargestellt.

Tab. 40: Parameter für die massenspektrometrische Untersuchung der Spaltsequenz von DAIP über LC-ESI-MS

Stationäre Phase:	Phenomenex® Jupiter® 5u C4
Säulenabmessung:	50 x 1 mm
Partikeldurchmesser:	5 µm
Porengröße:	300 Å
Mobile Phasen:	Milli-Q mit 0.1% (v/v) Ameisensäure (Eluent A) Acetonitril mit 0.1% (v/v) Ameisensäure (Eluent B)
Flussrate:	0.2 ml min ⁻¹

Tab. 41: Ablaufschema der der MS vorgeschalteten LC

Arbeitsschritt	Eluent A / %	Eluent B / %	Volumen / ml
Äquilibrieren	98	2	10
Probenauftrag	-	-	0.05
linearer Gradient	98-0	2-100	2
Regenerierung	0-98	100-2	10

2.5.3. Festphasenpeptidsynthese (SPPS)

Reagenzien:

Funktion	Reagenz
Festphase mit Linker	NovaSyn® TGR resin (Merck)
	Fmoc-L-Ala-OH
	Fmoc-L-Asp(tBu)-OH
	Fmoc-Gly-OH
Aminosäure	Fmoc-L-Lys(BOC)-OH
	Fmoc-L-Phe-OH
	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH
	Fmoc-L-Val-OH
Entschützung von N ^α	20% Piperidin in DMF
Carboxylgruppen-Aktivierung	HBTU 3.9 eq. in DMF
	DIEA 8 eq. in DMF
Waschung nach jedem Kupplungsschritt	N,N-Dimethylformamid, DMF
	N,N-Dimethylformamid, DMF
Waschung vor Abspaltung	Dichlormethan, DCM
	Diethylether
	94% (v/v) Trifluoressigsäure, TFA
Abspaltung vom Harz	2% (v/v) Triethylsilan, TES
	2% (v/v) Anisol
	2% (v/v) VE-Wasser
Fällung und Reinigung	Methyl-tert-butylether, MTBE (tiefgekühlt)

Zur synthetischen Herstellung spezifischer Peptide wurde im Rahmen dieser Arbeit mit diversen Abweichungen die Mikrowellen-unterstützte Festphasenpeptidsynthese (solid phase peptide synthesis) nach Merrifield genutzt (Merrifield, 1964; Yu *et al.*, 1992; Mitchell, 2008). Die Synthese des Peptids erfolgt dabei vom C- zum N-Terminus. Um eine hohe Ausbeute zu erhalten und Racemerisierung während der Kupplung zu vermeiden, müssen reaktive Seitenketten der Aminosäuren über den gesamten Synthesevorgang geschützt bleiben. Dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit Fmoc-Lysin mit einer BOC-Gruppe sowie Serin und Aspartat mit einer tBu-Gruppe verwendet. Nach jeder Kupplungsreaktion wurde Fmoc von der α -Amino-Gruppe der gebundenen AS basisch entfernt und die Carboxylfunktion der nächsten AS aktiviert.

Bei der SPPS finden die Kupplungsreaktionen, im Gegensatz zur Flüssigphasenpeptidsynthese (LPPS), auf einer festen Oberfläche statt, wobei es sich dabei in den meisten Fällen um ein polymeres Harz handelt. Der Überschuss an Reagenzien kann dabei leicht durch Filtration und Waschschrte entfernt werden, während kovalent an das Harz gebundenes Peptid im Reaktionsgefäß verbleibt. Nach Abschluss der Synthese muss schließlich das fertige Peptid vom Harz abgespalten sowie alle Schutzgruppen der Seitenketten entfernt werden. Dies geschieht im Zuge der Fmoc-Strategie durch Zugabe eines speziellen „Abspaltcocktails“.

Alle Syntheseschritte erfolgten in 25 ml Spritzen mit Schutzkappe. Das Solvens war DMF. Jeder Kupplungsschritt wurde dabei als Doppel-Kupplungs-Reaktion mit einem vierfachen molaren Überschuss der zu kuppelnden Aminosäure durchgeführt. Die Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe wurde ebenfalls als doppelte Entschützung ausgeführt. Das als Festphase genutzte Harz wurde vor Synthesebeginn zunächst 60 min mit DCM und anschließend 30 min in DMF unter Schütteln vorgequollen, um die Zahl der freien Bindungsstellen zu erhöhen. Der genaue Ablauf der SPPS zur Herstellung von 0.1 mmol = 1 eq. eines Peptids ist nachfolgend in Tab. 42 dargestellt.

Tab. 42: Durchführung einer Festphasenpeptidsynthese nach Mitchell (2008): Zwischen jedem Kopplungs- und Entschützungs-schritt wurde dabei fünfmal mit 5 ml DMF gespült. Die Schritte Aktivierung bis Abspaltung von Fmoc wiederholen sich mit jeder zusätzlichen Aminosäure.

Arbeitsschritt	Reagenz			Dauer
Vorquellen des Harz	10	ml	DCM	60 min
	10	ml	DMF	30 min
Aktivierung der Aminosäure	8.0	eq.	DIEA	5 min, RT
	3.9	eq.	HBTU	
	4.0	eq.	Fmoc-AS	
	3	ml		
Kupplung an Harz/Peptid x 2	-			2x 15 min, 50 °C, 30 W
Abspaltung von Fmoc x 2	20	% (v/v)	Piperidin	1. 30 s
	80	% (v/v)	DMF	2. 5 min
	3	ml		50 °C, 30 W
abschl. Waschen	4	ml	DMF	-
	4	ml	DCM	
	4	ml	Diethylether	
Trocknung in Exsikkator	-			ü.N.
Abspaltung von Harz und Entschützung der Seitenketten („Abspaltcocktail“)	94	% (v/v)	TFA	3 h unter Schütteln, RT
	2	% (v/v)	TES	
	2	% (v/v)	Anisol	
	2	% (v/v)	VE-Wasser	
	5	ml		
Fällung des Zielprodukts x 1	35	ml	MTBE, kalt	15 min, 4000 rpm, 4 °C
x 3	15	ml		

2.5.4. Proteinsequenzanalyse durch Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Proteinsequenzanalyse wurden am Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut der Universität Tübingen (NMI) durchgeführt. Hierzu wurden Proteinbanden nach der denaturierenden Elektrophorese aus dem SDS-PA-Gel ausgeschnitten und die Gelfragmente dem NMI zugesandt, wo die weitere Analytik durchgeführt wurde. Zur Vorbereitung der Analyse wurde eine enzymatische In-Gel-Hydrolyse der Proteinproben mit Trypsin in Coomassie-gefärbten SDS-PA-Gelen nach der Methode von Shevchenko *et al.* (2006) durchgeführt.

2.5.4.1. LC-MS-MS-Analyse der tryptisch verdauten Proteinproben

Zur Vorbereitung der Proben für die LC-MS/MS wurden 10-20 ml 0.1% (v/v) TFA zugegeben, gemischt und für 2-5 min im Ultraschallbad inkubiert. Anschließend wurde 15 min bei 6.7 x g zentrifugiert und der Überstand für die weitere Analyse genutzt.

Die Nano-HPLC-ESI-MS wurde an einem UltiMate 3000 nano-RSLC-System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) gekoppelt mit einem Maxis 3G ESI Quadrupol-UHRTOF MS/MS Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen) nach Tab. 43 und Tab. 44 durchgeführt.

Tab. 43: Parameter für die Nano-HPLC-ESI-MS

Säule:	Acclaim PepMap100
Säulenabmessung:	75 µm x 20 mm
Partikeldurchmesser:	C ₁₈ 3 µm
Porengröße:	100 Å
Mobile Phasen:	Milli-Q mit 0.1% (v/v) Ameisensäure (Eluent A) Acetonitril mit 0.1% (v/v) Ameisensäure (Eluent B)
Flussrate:	300 nl min ⁻¹

Tab. 44: Ablaufschema der Nano-HPLC

Arbeitsschritt	Eluent A / %	Eluent B / %	Volumen / nl
Äquilibrieren	98	2	10
Probenauftrag	-	-	0.05
linearer Gradient	97	3	900
	97-55	3-45	9 000
	55-10	45-90	300
	10	90	1 140
Regenerierung	10-97	90-3	300
	97	3	6 000

Die anschließende ESI-MS wurde im positiven Ionisations-Modus bei einer Kapillarspannung von 5 000 V, einer -temperatur von 150 °C und einem trockenen Stickstoffstrom von 1 l min⁻¹ durchgeführt. Über TOF wurde ein Massenbereich von 50 bis 2 200 m/z detektiert, als Standard diente Hexakis-(1H,1H,4H-Hexafluorobutyloxy)-phosphazin (m/z = 1 222).

Die Datenanalyse erfolgte über DataAnalysis 4.0.2 und ProteinScape V2.1.0.573 (Bruker Daltonics, Bremen), die Proteinidentifikation über Mascot Search Engine V2.3.02 (Matrix Science Inc, Boston, MA, USA) und Swiss Prot Datenbank-Analyse. Folgende Parameter für die Suche wurden gewählt: bis zu zwei übersprungene Hydrolyseschnittstellen des Trypsins sowie Akzeptanz von Carbamidomethyl-Cystein als variable Aminosäuremasse, Peptidladungen von +1 bis +3, MS-Toleranz von ± 7 ppm und MS/MS-Toleranz von ± 0.05 Da, Mascot Score-Akzeptanz >25 für Peptide und >30 für Proteine.

3. Ergebnisse

3.1. Aufklärung des SPI-codierenden Gens

Um eine weitere Charakterisierung des *Streptomyces*-Papaininhibitors zu erreichen, war die Aufklärung der Aminosäuresequenz essenziell. Zu diesem Zweck und im Sinne einer angestrebten heterologen Produktion des Proteins wurde mit den nachfolgenden Untersuchungen das SPI-codierende Gen aufgeklärt.

3.1.1. Erstellung einer SPI-spezifischen DNA-Sonde zur Detektion des Gens

Zu Beginn dieser Arbeit war nur das N-terminale Peptid des SPI bekannt, welches nach einem Datenbankabgleich Homologie zu einem funktionell unbekannten Protein von *S. lavendulae* aufwies (Abb. 12; Mao *et al.*, 1999; Sarafeddin *et al.*, 2011; Q9X5U4; GenBank: AAD32751.1). Entsprechend wurde das mutmaßliche Protein Q9X5U4 nachfolgend als Basis für die Erstellung der PCR-Oligonukleotide zur Herstellung der SPI-spezifischen DNA-Sonde herangezogen.

<i>S. mobaraensis</i>	DIPIGQKMTGKMTYYTDKGY
<i>S. lavendulae</i>	MRGSKALRYAAPVLVAAATGIALAAGPAAVPIGQSVNGKMTYYTDQGYGACGTPIDANS
	:****.:.*****:*

Abb. 12: Sequenzalignment der bekannten N-terminalen Aminosäuresequenz von SPI mit dem homologen Bereich eines Proteins von *S. lavendulae* nach Sarafeddin *et al.* (2011): Das analysierte N-terminale Segment wurde mit der NCBI-Datenbank verglichen und anschließend zur Veranschaulichung durch die Online-Version der Software ClustalW2 mit der vorhandenen Primärstruktur des unbekannten Proteins von *S. lavendulae* aligniert. * = Seitenkette identisch; : = hohe Konservierung der Seitenkette; . = niedrige Konservierung der Seitenkette

Der Vorwärtsprimer wurde durch den bekannten SPI-N-Terminus definiert. Für die Ableitung des Rückwärtsprimers wurde ein Bereich innerhalb des *S. lavendulae*-Proteins gewählt, dessen Homologie zu SPI wahrscheinlich war. Da aus früheren Arbeiten eine hohe Thermostabilität des SPI bekannt war

(Sarafeddinov *et al.*, 2011), wurde für die Tertiärstruktur des Inhibitors das Vorhandensein mindestens einer Cystinbrücke angenommen. Aufgrund dieser Tatsache war eine Homologie im Bereich der Cysteinreste innerhalb des SPI sowie des *S. lavendulae*-Proteins naheliegend. Daher wurde dieser Bereich zur Ableitung des Rückwärtsprimers genutzt.

Das Protein von *S. lavendulae* weist vier Cysteine in den Positionen 52, 82, 104 und 107 auf (rot eingefärbt in Abb. 13B). Um eine möglichst stringente Bindung der DNA-Sonde während der Southern Blot-Analyse zu erhalten, musste die Lage des Rückwärtsprimers einen entsprechenden Abstand zum N-Terminus des Proteins haben. Aufgrund der Entfernung von Cys104 und Cys107 zum N-Terminus wurde dieser Bereich für die Ableitung des Rückwärtsprimers herangezogen, da hierdurch für nachfolgende Untersuchungen ein ausreichend großes Amplifikat zu erwarten war.

Zu Beginn der molekularbiologischen Arbeiten für die Aufklärung des SPI-codierenden Gens musste jedoch erst die spezifische Nutzungsverteilung der aminosäurecodierenden Nukleotidtripletts von *S. mobaraensis* ermittelt werden. Durch Verwendung häufig genutzter Codons als Grundlage für PCR-Primer ist die Erfolgswahrscheinlichkeit, eine nutzbare DNA-Sonde zu erhalten, wesentlich erhöht. Zur Ermittlung der Statistik wurden zehn in der ExPASy-Datenbank vorhandene sequenzierte Gene von *S. mobaraensis* miteinander verglichen und eine Häufigkeitsverteilung erstellt (Tab. 57).

Unter Zuhilfenahme der Nutzungshäufigkeit von Codons durch *S. mobaraensis* (Tab. 57) wurde der Bereich für die Ableitung des degenerierten Primers so gewählt, dass sich eine Nukleotidsequenz mit einer möglichst niedrigen Anzahl an Variationen ergab. Diese Vorgaben erlaubten im Bereich der Nukleotidsequenz entsprechend der Primärstruktur zwischen Cys107 und Leu114 des Proteins von *S. lavendulae* die Ableitung eines degenerierten Primers, der nur vier verschiedene Nukleotidvariationen aufwies (SPI_rev_SZ). In Kombination mit dem ebenfalls degenerierten Vorwärtsprimer SPI_for_SZ, der im Bereich der Nukleotidsequenz entsprechend den Aminosäuren Met12 bis Gly19 des SPI-N-Terminus abgeleitet wurde und

ebenfalls nur vier Varianten aufwies (Abb. 13), ergab sich somit eine höchstmögliche Anzahl von 16 Primerkombinationen.

A DIPIGQ¹⁰KMTG KMTYYTDKGY²⁰

B MRGSKALRYA¹⁰ APVLVAAATG²⁰ IALAAGPAAA³⁰ VPIGQSVNGK⁴⁰ MTYYTDQGYG⁵⁰ ACGTPIDANS⁶⁰ QDLVAVPAAW⁷⁰
WTSANPNNDQ⁸⁰ LCQGISVEVS⁹⁰ YNGRTIRVPV¹⁰⁰ RDKCPS¹¹⁰CDRT HIDLSRTAFQ¹²⁰ KLAPLDRGVV¹³⁰ NGITWKFVR

Abb. 13: Für die Ableitung von Oligonukleotiden verwendete Peptide von SPI aus *S. mobaraensis* (A) und des mutmaßlichen Proteins Q9X5U4 von *S. lavendulae* (B): Die Peptidsequenzen sind unterstrichen. Die Ableitung der Nukleotidssequenz erfolgte auf Grundlage der Nutzungshäufigkeit der Codons aus Tab. 57. Die Cysteinreste sind rot markiert. Die Nukleotidsequenzen der Primer sind in 2.1.3. gelistet.

Die PCR bei verschiedenen Prähybridisierungstemperaturen ergab mehrere distinkte Banden (Abb. 14), die ausgeschnitten, extrahiert und mithilfe des für die PCR verwendeten Primers SPI_for_SZ sequenziert wurden.

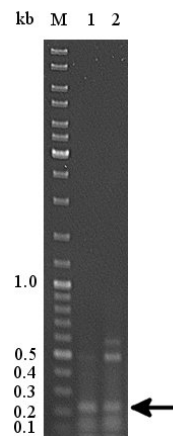


Abb. 14: Amplifikate einer PCR mit den degenerierten Primern SPI_for_SZ und SPI_rev_SZ sowie genomischer DNA von *S. mobaraensis* bei zwei verschiedenen Prähybridisierungstemperaturen: Die PCR wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt und die erhaltenen Reaktionsmischungen wurden elektrophoretisch getrennt. 1 = 30 °C Prähybridisierungstemperatur, 2 = 42 °C Prähybridisierungstemperatur; M = GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas).

Die Sequenzierung der extrahierten 0.22 kb-Fragmente (Abb. 14, Spur 1 und 2, mit Pfeil markiert) ergab in beiden Fällen eine identische Nukleotidsequenz (Abb. 15A). Ein Vergleich mit in der NCBI-Datenbank gelisteten Genen zeigte,

dass die übersetzte DNA-Sequenz im detektierten Bereich zu dem Protein von *S. lavendulae* eine Identität von 84% auf Aminosäureebene aufwies. Zur Verbildlichung der identischen Bereiche wurde nachfolgend ein Sequenzalignment mittels der Online-Version der Software ClustalW2 durchgeführt, welches in Abb. 15B dargestellt ist.

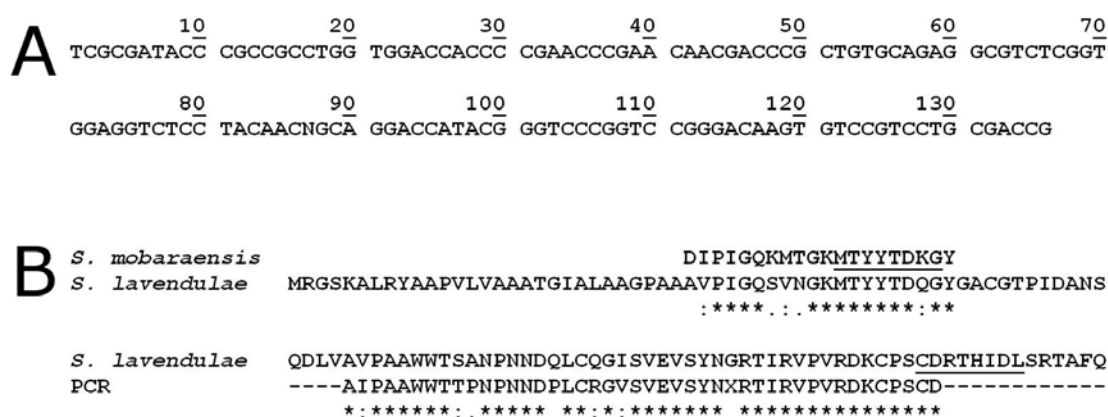


Abb. 15: Nukleotidsequenz und Sequenzalignment eines sequenzierten 0.22 kb-PCR-Amplifikats produziert mit DNA von *S. mobaraensis*. A: Das Fragment wurde nach der Elektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten und extrahiert. Für die Sequenzierung wurden ca. 35 ng DNA sowie 3.2 pmol SPI_for_SZ eingesetzt. Das Gesamtvolumen von 7 µl wurde mit 10 mM Tris-HCl, pH 8.5, ergänzt. N = unbekanntes Nukleotid. B: Die über DNA-Sequenzierung mittels SPI_for_SZ erhaltenen Nukleotiddaten des PCR-Produktes wurden in die Aminosäuresequenz übersetzt und mit der Onlineversion der Software ClustalW2 gegen das unbekannte Protein von *S. lavendulae* aligniert. Unterstrichen ist der Bereich innerhalb des SPI, der zur Ableitung des Vorwärtsprimers herangezogen wurde, sowie der Bereich innerhalb des *S. lavendulae*-Proteins, der für die Ableitung des Rückwärtsprimers für die PCR herangezogen wurde.

Da ein NCBI-Datenbankabgleich mit den Sequenzen der PCR-Amplifikate ebenfalls zum unbekannten Protein von *S. lavendulae* führte wie der zuvor analysierte SPI-N-Terminus, lag nahe, dass es sich um einen Teil des SPI-Gens handelte. Die Größe des Inhibitors wurde von Sarafeddinov *et al.* mit ungefähr 12 kDa angegeben (2011), das unbekannte Protein von *S. lavendulae* weist nach der Sekretion eine mutmaßliche Größe von 11 935.91 Da (ExPASy-Peptide-Mass Calculator, Stand: März 2012) und eine mutmaßliche Länge von 109 Aminosäuren auf. Dies entspricht einer codierenden Gensequenz exklusive Stoppcodon von 327 Nukleotiden. Da beide Proteine offensichtlich eine

ähnliche Größe haben, wurde auch die Länge des Gens als annähernd identisch angenommen.

3.1.2. Identifizierung des SPI-codierenden Gens

Nachdem ein Genabschnitt des SPI durch Sequenzierung und Datenbankvergleich identifiziert war, sollte auf dieser Grundlage das vollständige Gen aufgeklärt werden. Durch Hydrolyse genomischer DNA mittels verschiedener Restriktionsendonukleasen sollten Fragmente erzeugt werden, die mittels der im Vorfeld erzeugten spezifischen DNA-Sonde in einer Southern Blot-Analyse die Markierung des *spi*-Gens erlaubten. Anschließend sollten Fragmente mit komplementären Enden in Vektoren einkloniert und *E. coli* damit transformiert werden. Nach einem Screening der so erzeugten Transformanten sollten Plasmide mit dem *spi*-Gen-tragenden Fragment identifiziert und sequenziert werden, um das gesamte codierende Gen zu aufzuklären.

Zu Beginn musste bestimmt werden, welche Restriktionsenzyme das Genom von *S. mobaraensis* sinnvoll hydrolysieren. Hierzu wurde die Datenbank des Department of Immunology, Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of the Basque Country, genutzt. Mithilfe dieser Datenbank ließ sich eine *in silico*-Simulation des enzymatischen Abbaus durchführen, wobei die Genome von *S. avermitilis* MA-4680 (Ikeda *et al.*, 2003), *S. coelicolor* A3(2) (Bentley *et al.*, 2002), *S. griseus subsp. griseus* NBRC 13350 (Ohnishi *et al.*, 2008) und *S. scabies* 87.22 (Bignell *et al.*, 2010) als Vergleich herangezogen (Stand: Juli 2011) und nach den folgenden Kriterien selektiert wurden:

- Zielvektor pBlueskript SK (+) weist die entsprechende Schnittstelle genau einmal auf
- Das bekannte SPI-Gensegment weist keine Schnittstelle für das Enzym auf
- Die durchschnittliche Länge der Fragmente sollte 5 bis 10 kb betragen, wobei dieses Kriterium wegen fehlender Sequenzinformation für das *S. mobaraensis*-Genom zweitrangig war.

Von den Restriktionsenzymen, die diese Voraussetzungen erfüllten, wurden *Bam*HI (mutmaßlich 2100-3000 Fragmente), *Eco*RI (300-600), *Eco*RV

(150-250), *KpnI* (1140-2020), *PstI* (840-3200) und *XhoI* (400-1900) für die weitere Verwendung ausgewählt. Mithilfe der genannten Enzyme wurde eine Genomrestriktion durchgeführt. Die Proben wurden im Anschluss gelelektrophoretisch getrennt (Abb. 16A) und mittels Southern Blot-Analyse durch Hybridisierung mit einer spezifischen DNA-Sonde, die auf der Sequenz des bereits identifizierten Genfragments beruhte, auf das Vorhandensein des SPI-Gens hin untersucht (Abb. 16B).

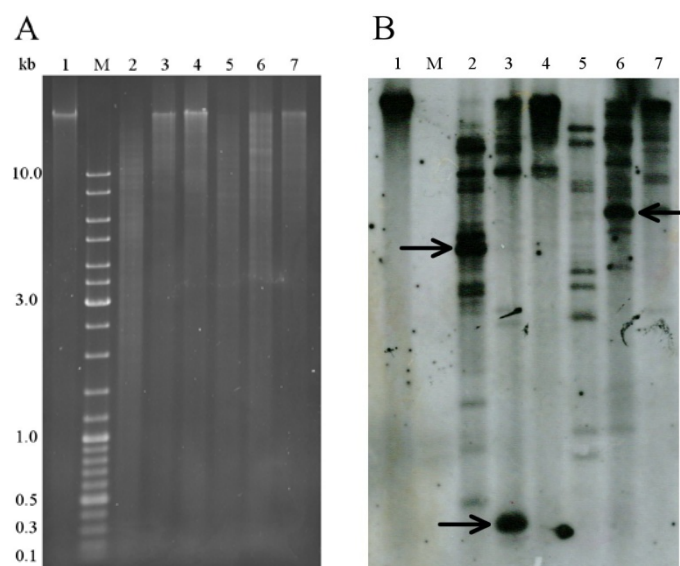


Abb. 16: Agarosegel (A) und Southern Blot (B) zum Nachweis des *spi*-Gens in fragmentierter genomischer DNA von *S. mobaraensis*: 25 µg genomische DNA wurden ü.N. mit 10 U eines Restriktionsenzym nach Herstellerangaben inkubiert. Die elektrophoretische Trennung sowie die Southern Blot-Analyse erfolgten wie im Methodenteil beschrieben. Die mit einem Pfeil in B markierten Banden wurden durch Größenvergleich mit dem Agarosegel (A) aus einem zweiten - bis zur Elektrophorese gleichbehandeltem - Agarosegel ausgeschnitten und extrahiert. Spur 1: Genomische DNA; Spur 2: *Bam*HI-Hydrolysat; Spur 3: *Eco*RI-Hydrolysat; Spur 4: *Eco*RV-Hydrolysat; Spur 5: *Kpn*I-Hydrolysat; Spur 6: *Pst*I-Hydrolysat; Spur 7: *Xho*I-Hydrolysat; M = GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas).

Die Southern Blot-Analyse zeigte in jedem Hydrolysat Fragmente mit sondenkomplementärer DNA. Nach Auswahlkriterien wie guter Erreichbarkeit beim Ausschneiden, potentieller Größe und Distinktion wurden DNA-Fragmente der Hydrolyse mit *Bam*HI, *Eco*RI und *Pst*I entsprechend der in Abb. 16B mit einem Pfeil markierten Banden aus einem zweiten, gleich behandelten Agarosegel ausgeschnitten, extrahiert, mit einem entsprechend hydrolysierten Vektor ligiert und *E. coli* damit transformiert.

Anschließend wurde eine PCR-basierte Screening-Methode mit hohem Durchsatz angewandt, um das gesuchte DNA-Fragment mit dem *spi*-Gen zu identifizieren. Nach der Transformation wurden hierzu Einzelkolonien, die durch Blau-Weiß-Selektion nach R  ther (1980) bereits als potentiell positiv identifiziert worden waren, mittels eines sterilen Zahnstochers in 100 µl LB_{Amp}-Medium überführt, welches in den Kavitäten acht steriler 96-Well-Mikrotiterplatten vorgelegt war. Die Kultivierung erfolgte stehend bei 37   C   .N. Im Anschluss wurden Proben der Flüssigkulturen jeder einzelnen Mikrotiterplatte vereinigt und als Mischtemplate für eine Kolonie-PCR mit den genspezifischen Primern SPI_for_SZ und SPI_rev_SZ eingesetzt (Abb. 17).

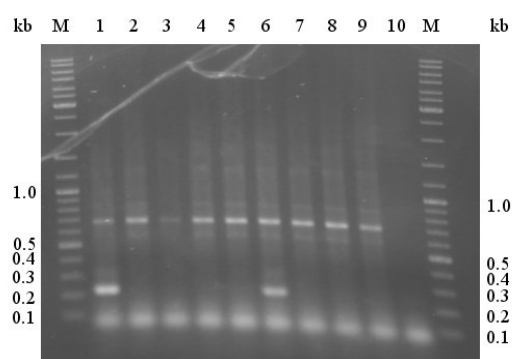


Abb. 17: Kolonie-PCR mit *E. coli*-Flüssigkulturen zur Identifizierung von Transformanten mit SPI-codierendem Gen: Von 96 über-Nacht-Kulturen verschiedener Mikrotiterplatten wurden jeweils 10 µl vereinigt. 5 µl dieser Zellmischungen wurden als PCR-Template verwendet. Zur Identifikation der positiven Klone wurden die genspezifischen Primer SPI_for_SZ und SPI_rev_SZ eingesetzt. Spuren 1 – 8: Mikrotiterplatte 1 - 8; Spur 9: Negativkontrolle mit *E. coli*-Klon ohne SPI-Gen; Spur 10: Kontrolle mit H₂O statt DNA-Template; M = GeneRulerTM DNA Ladder Mix (Fermentas)

Abb. 17 zeigt in den Spuren 1 und 6 eine Bande bei ungefähr 0.22 kb, was der erwarteten Größe des bisher bekannten SPI-Genfragments entsprach. Alle anderen Spuren zeigten dasselbe Bandenmuster wie die Kontrolle mit einem bereits mittels Blau-We  -Selektion ermittelten negativen Klon (Spur 9). Die Kolonien der Platten 1 und 6 mussten jedoch wenigstens eine Transformante mit dem SPI-Gen enthalten. Zur weiteren Eingrenzung wurden die Kulturen der beiden Platten zeilenweise vereinigt und wie zuvor als Mischtemplate für eine zweite Kolonie-PCR eingesetzt (Abb. 18).

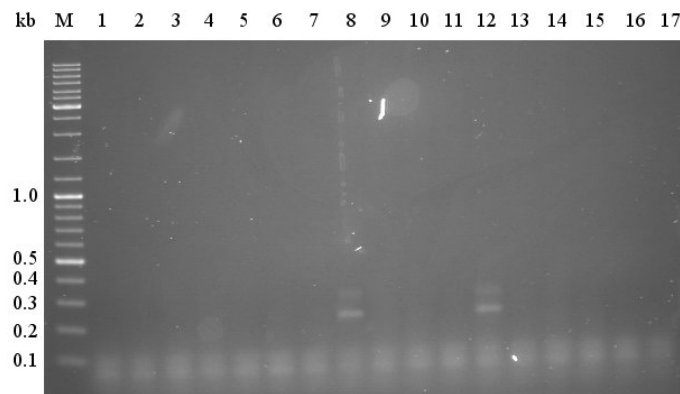


Abb. 18: Kolonie-PCR mit *E. coli*-Flüssigkulturen der Mikrotiterplatten 1 und 6 für den Nachweis SPI-codierender Transformanten: Die Kolonien wurden wie unter Abb. 17 beschrieben angezogen, zeilenweise vereinigt, aufgearbeitet und mittels PCR untersucht. Spuren 1 - 8: Platte 1, Zeilen A – H; Spuren 9 – 16: Platte 6, Zeilen A – H; Spur 17: Kontrolle mit H₂O statt DNA-Template; M = GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas)

Durch Untersuchungen der einzelnen Zeilen A - H innerhalb der Mikrotiterplatten konnte eine weitere Eingrenzung erreicht werden. So zeigte sich nur in Zeile H von Platte 1 sowie in Zeile D von Platte 6 eine entsprechende Bande bei ca. 0.22 kb (Abb. 18, Spur 8 bzw. 12). Abschließend wurden die Kulturen in den entsprechenden Zeilen einzeln auf das Vorhandensein des SPI-Gens hin untersucht (Abb. 19).

Mithilfe der Screeningmethode konnten zwei Transformanten bestimmt werden, die ein Genomfragment aufgenommen hatten, welches das *spi*-Gen beinhaltete. Die Transformanten auf Platte 1, Zeile H, Position 7 (im Folgenden als Klon 1_H7 benannt) bzw. auf Platte 6, Zeile D, Position 7 (Klon 6_D7) waren positiv und wurden für weitere Untersuchungen herangezogen.

Der Vergleich mit den vorherigen Restriktionsdaten zeigte, dass es sich bei 1_H7 um eine Transformante handelte, deren aufgenommenes *S. mobaraensis*-Genomfragment aus *Bam*HI-Hydrolyse, wohingegen das Fragment des 6_D7-Klons aus *Pst*II-Hydrolyse stammte. Somit dürfte die insertierte Genomsequenz bei 1_H7 eine Länge von ungefähr 4 kb und bei 6_D7 eine Länge von ungefähr 5 kb aufweisen (vgl. Abb. 16A und B).

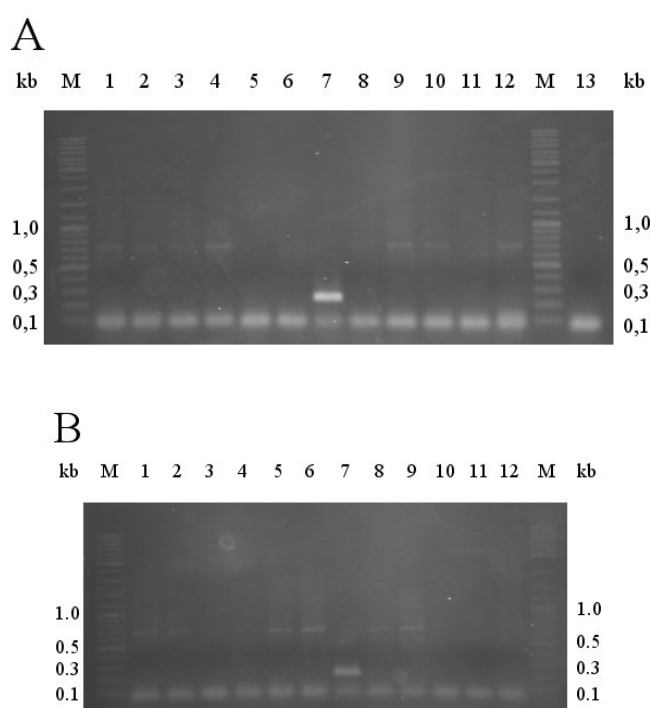


Abb. 19: Kolonie-PCR mit *E. coli*-Flüssigkulturen der Mikrotiterplatten 1-H (A) und 6-D (B) zur Identifizierung SPI-codierender Transformanten: Die Flüssigkulturproben wurden per sterilem Zahnstocher in 200 µl-Gefäße, in denen sich bereits die PCR-Reaktionsmischung befand, überführt. Zur Identifikation der positiven Klone wurden die genspezifischen Primer SPI_for_SZ und SPI_rev_SZ eingesetzt. Spuren 1 – 12 (A und B): Klon von 1-H/1-12 bzw. 6-D/1-12; Spur 13 (A): Kontrolle mit H₂O statt DNA-Template; M = GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas).

3.1.2.1. Sequenzierung der Klone 1_H7 und 6_D7

Zur Aufklärung des SPI-codierenden Gens wurden die Inserts der extrahierten Plasmide 1_H7 sowie 6_D7 sequenziert. Da die Lage des Gens innerhalb des Genomfragments unbekannt war, wurden einerseits die genspezifischen PCR-Primer SPI_for_SZ und SPI_rev_SZ und andererseits die vektorspezifischen Standard-Sequenzierprimer M13 *forward* (-20) und M13 *reverse* verwendet.

Bereits die Analyse mit den genspezifischen Primern führte in beiden Fällen zur Aufklärung des vollständigen SPI-Leserahmens (engl. Open Reading Frame; *orf*). Durch Sequenzierung mit den beiden genspezifischen Primern konnten gegenläufige DNA-Abschnitte identifiziert werden, durch deren Alignment der komplette *orf* abgedeckt wurde. Die Daten beider Klone ergaben 100% identische Nukleotidsequenzen (Abb. 20).

```

M R E F R R V R R V R F A A C A L V A A
ATGCGTGAAT TCAGGCGAGT GCGCCGAGTT CGTTTCGCCG CCTGCGCTCT GGTGCGCCGC

A T G I T L A A G P A S A D I P I G Q K
GCGACGGTA TCACCCTCGC CGCGGGACCG GCCTCGGCCG ACATTCCGAT CGGCCAGAAG

M T G K M T Y Y T D K G Y G A C G T P I
ATGACCGGCA AGATGACCTA CTACACCGAC AAGGGCTACG GCGCCTGCGG AACGCCGATC

D A S S Q D L V A I P A A W W T T P N P
GACGCCTCGT CGCAGGACCT GGTGCGGATA CCCGCCGCCCT GGTGGACCAC CCCGAACCCG

N N D P L C R G V S V E V S Y N G R T I
AACACGACC CGCTGTGCAG AGGCGTCTCG GTGGAGGTCT CCTACAACGG CAGGACCATA

R V P V R D K C P S C D R T H I D L S Q
CGGGTCCCGG TCCGGGACAA GTGTCCGTCC TGCGACCGGA CGCACATAGA CCTCAGCCAG

A A F A K L A P L D R G V V N G I T W K
GCGGCTTTTCG CCAAGCTCGC GCCGCTGGAC CGGGGTGTGG TCAACGGAAT CACCTGGAAG

F V R *
TTCGTCCGCT GA

```

Abb. 20: SPI-codierende Nukleotid- und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz der Klonen 1_{H7} und 6_{D7}

Der Abgleich der so erhaltenen DNA-Sequenzen mit der NCBI-Datenbank zeigte 79% Identität auf Aminosäureebene mit dem unbekannten Protein von *S. lavendulae*, das bereits durch Datenbankabgleich mit dem N-Terminus des SPI identifiziert wurde (Abb. 21).

```

S. mobaraensis MREFRRVRRVRFACALVAAATGITLAAGPASADIPIGQKMTGKMTYYTDKGYGACGTPI 60
S. lavendulae MR---GSKALRYAAPVLVAAATGIALAAGPAAA-VPIGQSVNGKMTYYTDQGYGACGTPI 56
**      : :*:** .*****:*****:* :****.:.*****:*****

S. mobaraensis DASSQDLVAIPAAWTTTPNPNNDPLCRGVSVEVSYNGRTIRVPVRDKPSCDRTHIDLSQ 120
S. lavendulae DANSQDLVAVPAAWTTSANPNNDQLCQGISVEVSYNGRTIRVPVRDKPSCDRTHIDLSR 116
** .*****:*****: ***** **:*:*****:*****:*****:*****:*****:*****

S. mobaraensis AAFAKLAPLDRGVVNGITWKFVR 143
S. lavendulae TAFQKLAPLDRGVVNGITWKFVR 139
: ** *****

```

Abb. 21: Aus SPI-codierender DNA abgeleitete Aminosäuresequenzen von *S. mobaraensis* im Vergleich mit dem mutmaßlichen Protein Q9X5U4 von *S. lavendulae*: Die übersetzten DNA-Daten wurden mittels der Online-Version der Software ClustalW2 mit der übersetzten Primärstruktur des unbekannten Proteins von *S. lavendulae* verglichen. Der vormalig bekannte SPI-N-Terminus ist unterstrichen. * = Seitenkette identisch; : = hohe Konservierung der Seitenkette; . = niedrige Konservierung der Seitenkette

3.1.2.2. Charakterisierung des Papaininhibitors anhand seiner Primärstruktur

Ein vollständiger Abgleich der Aminosäuresequenz des SPI mit der NCBI-Datenbank erbrachte neben dem bereits erwähnten unbekannten Protein von

S. lavendulae (79% Identität, Mao *et al.*, 1999) eine ähnlich hohe Sequenzhomologie im Bezug auf zwei putative Lipoproteine von *S. clavuligerus* bzw. *Actinosynnema mirum* (71%, Medema *et al.*, 2010, bzw. 63% Identität, Land *et al.*, 2009). Vergleichbare Sequenzhomologien ergaben sich ebenfalls mit einem hypothetischen Protein von *Amycolatopsis mediterranei* und einem bisher unbenannten Proteinprodukt von *S. cattleya* (67%, Zhao *et al.*, 2010, bzw. 63% Identität, Barbe *et al.*, 2011). Alle genannten Stämme gehören wie auch *S. mobaraensis* der Ordnung der Actinomyceten an, was eine funktionelle Verwandtschaft der Proteine nahe legt.

Tab. 45: Ergebnis des NCBI-Datenbankvergleichs mit der aufgeklärten Primärstruktur von SPI: Aufgeführt sind die fünf Proteine, die im Bezug auf das e-Value den kleinsten und somit besten Wert aufweisen. Ebenfalls aufgeführt ist die Identität der verglichenen Proteine mit dem SPI sowie die Länge der betreffenden Proteine.

Protein	Stamm	e-Value	Identität	Länge
Unknown Protein (Q9X5U4)	<i>Streptomyces lavendulae</i>	$1 \cdot 10^{-66}$	79%	139 aa
Rare lipoprotein A (E2Q0H2)	<i>Streptomyces clavuligerus</i> ATCC 27064	$1 \cdot 10^{-50}$	71%	204 aa
Hypothetical protein (Q93MF1)	<i>Amycolatopsis mediterranei</i> U32	$6 \cdot 10^{-45}$	67%	137 aa
Rare lipoprotein A (C6WQE6)	<i>Actinosynnema mirum</i> DSM 43827	$7 \cdot 10^{-44}$	63%	134 aa
Unnamed protein product (F8JME3)	<i>Streptomyces cattleya</i> NRRL 8057	$4 \cdot 10^{-44}$	63%	140 aa

SPI besitzt nach der Biosynthese am Ribosom bzw. vor der Sekretion offensichtlich eine Länge von 143 aa (Abb. 22). Die nach dem Datenbankvergleich homologen Proteine haben mit Ausnahme des Rare Lipoprotein A von *S. clavuligerus* eine Länge von 134 aa bis 140 aa (Tab. 45). Da jedoch die biologische Rolle der identifizierten Proteine bis dato nicht aufgeklärt ist, lassen sich hier auch keine weiteren Funktionalitäten des SPI ableiten.

```

      10      20      30      40      50      60      70
MREFRRVRRV RFAACALVAA ATGITLAAGP ASADIPIGQK MTGKMTYYTD KGYGACGTPĪ DASSQDLVAĪ
      80      90     100     110     120     130     140
PAAWWTTPNP NNDPLCRGVS VEVSYNGRTĪ RVPVRDKCPS CDRTHIDLSQ AAFAKLAPLD RGVVNGITWK

FVR

```

Abb. 22: Primärstruktur des SPI: Dargestellt ist die Aminosäuresequenz des SPI im Einbuchstabencode. Das Signalpeptid ist unterstrichen.

Legt man den durch Edman-Abbau analysierten N-Terminus von reifem SPI zugrunde, so besitzt das Translationsprodukt ein Signalpeptid von 33 aa (einschließlich Methionin), das mit der Präsequenz anderer exportierter Proteine von Streptomyceten gut übereinstimmt (Perlman und Halvorson, 1983; von Heijne und Abrahmsen, 1989; Nielsen *et al.*, 1997). Nach dem Methionin folgen sechs Argininreste, die das Einfädeln des Proteins in den Exportkanal erlauben und denen sich die typische hydrophobe h-Region anschließt. Auch das Bindemotiv für Signalpeptidasen, Ala-Xaa-Ala mit Serin als Xaa, ist vorhanden. Interessanterweise befindet sich in Position 15 ein Cysteinrest, über den potentiell eine Verankerung von SPI mit der äußeren Zellmembran möglich wäre.

Nach Abspaltung des Signalpeptids hat SPI eine Länge von 110 aa, eine kalkulierte Molmasse von 12 027.72 Da und einen theoretischen pI von 8.77 (ExPASy-Peptide-Mass Calculator, Stand: März 2012). Für eine Vernetzungsreaktion durch Transglutaminase stehen theoretisch drei Glutamin- und sechs Lysinseitenketten zur Verfügung. Sarafeddin *et al.* bestimmten für das Protein, ausgehend von einer 96 h-Kultivierung bei 28 °C (Fuchsbauer, persönliche Mitteilung), eine apparente Molmasse (SDS-PAGE, GPC) von ungefähr 12 000 Da und einen pI von 7.3. Das errechnete Molekulargewicht stimmt gut mit dem experimentell ermittelten Wert überein. Jedoch weisen theoretischer und experimenteller pI einen beträchtlichen Unterschied auf.

Als einzige konservierte Domäne ließ sich durch Homologievergleich mit der *Conserved Domain Database* (Stand: März 2012; Marchler-Bauer *et al.*, 2011) bei SPI im letzten Drittel eine *double-psi beta barrel*-Struktur (DPBB) nachweisen. Diese Domänenstruktur ist bereits für viele Superfamilien

nachgewiesen worden und kann somit nicht zu einer genaueren Charakterisierung des SPI herangezogen werden. Jedoch beinhaltet sie häufig das Aktivzentrum von Enzymen oder die Bindestelle für Kofaktoren (Castillo *et al.*, 1999).

Ein schematischer Aufbau des Proteins ist in Abb. 23 dargestellt.

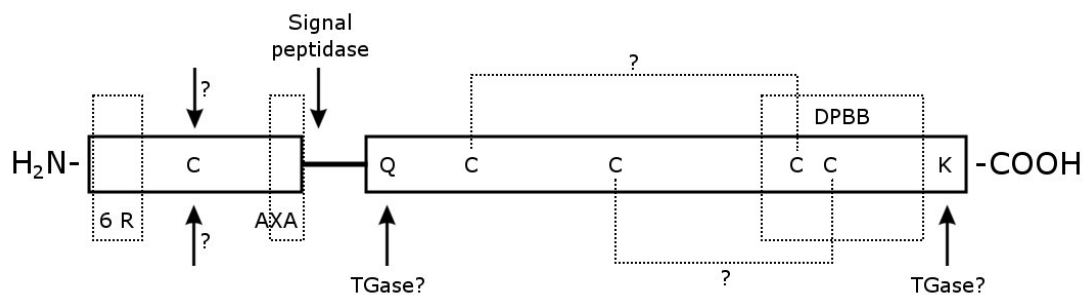


Abb. 23: Schematische Darstellung des *Streptomyces*-Papaininhibitors: Die markierte Spaltstelle einer Signalpeptidase, die Bindestellen von Transglutaminase (Q, K), die Cystinbrücken und ein *double-psi beta barrel*-Segment (DPBB) sind hypothetischer Natur.

3.2. Rekombinante Produktion vom SPI in *E. coli*

Für weiterführende Untersuchungen war es wichtig, eine Modifikation von SPI durch Transglutaminase während der Produktion mit *S. mobaraensis* vollständig auszuschließen. Um dies zu erreichen, eignet sich die rekombinante Produktion des Proteins in *E. coli*, weil das Bakterium nachweislich kein TGase-codierendes Gen besitzt (z.B. Blattner *et al.*, 1997). Die heterologe Expression von SPI erfolgte ohne das proteineigene Signalpeptid in unterschiedlichen *E. coli*-Stämmen mit verschiedenen Plasmiden. Die Vorkultivierung erfolgte bei allen Untersuchungen bei 37 °C; teilweise wurde vor der Induktion die Temperatur variiert.

3.2.1. Rekombinante Produktion von SPI mit His-Tag im Cytoplasma

Zur Produktion von SPI ins Cytoplasma wurden die beiden käuflichen Vektoren pET-21a (+) und pET-28a (+) der Firma Novogen verwendet. Beide Expressionsvektoren besitzen Genabschnitte, die für Histidin-Tags zur vereinfachten Isolation und Reinigung des Zielproteins codieren.

pET-21a (+) wurde von der AG Yildiz am MPI für Biophysik Frankfurt a. M. dahingehend modifiziert, dass zwischen den Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *SaI* Gene für eine Cysteinprotease-Domäne (CPD) aus *Vibrio cholerae* und ein Dekahistidin-Tag eingefügt waren. Durch Expression des SPI-CPD-His₁₀-Fusionsproteins sollte die Aufreinigung erleichtert werden, indem SPI nach Bindung des Fusionsproteins an eine IMAC-Säule durch CPD-Autolyse in Gegenwart von Inositolhexakisphosphat freigesetzt wird (Shen *et al.*, 2009). Damit entfällt eine Elution mit Imidazol. Das mit pET-28a (+) exprimierte SPI-Fusionsprotein wies einen N-terminalen His₆-Tag gefolgt von einer Erkennungssequenz für die Abspaltung des Zielproteins durch Thrombin auf.

Da die Expression des SPI-Gens auf pET-21a (+)_SPI und pET-28a (+)_SPI unter Kontrolle des T7-Promotors steht, war die Nutzung von *E. coli*-Stämmen nötig, welche die T7-RNA-Polymerase des λ -Prophagen (DE3) besitzen. Im Rahmen der Untersuchung kam daher der Stamm *E. coli* BL21 (DE3) sowie dessen beide Mutanten *E. coli* C41 (DE3) und C43 (DE3), die eine höhere Toleranz gegenüber toxischen Proteinen besitzen, zum Einsatz. Da eine toxische Wirkung des Proteins bereits in basalen Mengen auf den Wirtsorganismus nicht ausgeschlossen werden konnte, musste ebenfalls darauf geachtet werden, dass die Produktionsstämme ein pLysS-Plasmid besaßen. Die darauf befindliche Gensequenz codiert für ein T7-Lysozym, welches die basale T7-RNA-Polymerase durch Abbau inaktiviert. Die Proteinproduktion erfolgte in Autoinduktionsmedium bei 37 °C ü.N.

Es zeigte sich, dass nur bei Verwendung von pET-21a (+)_SPI ein mit *anti*-His-IgG nachweisbares Protein im Zelllysate von *E. coli* BL21 (DE3) vorhanden war (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich waren Einschlusskörper (EK) entstanden. Diese Proteinaggregate beinhalten neben Verunreinigungen fehlgefaltetes Protein, welches in der Zelle präzipitiert und dadurch die Menge an Protein im Lysat deutlich vermindert. Eine Variation der Inkubationstemperatur von 37 °C auf 31 °C und 42 °C brachte keine höhere Produktausbeute. Weiterhin war der Großteil in Form von EK präzipitiert. Da bei Nutzung des BL21-Stamms fast nur unlösliches Protein, bei Nutzung der C41- und C43-Stämme jedoch grundsätzlich gar kein Protein nachweisbar war, wurde im Anschluss nur noch das pET-21a (+)/BL21-System verwendet.

Die Verwendung des Chaperon Plasmid-Sets der Firma TaKaRa versprach eine verbesserte Faltung von rekombinant produzierten Zielproteinen (*rSPI*) und damit eine erhöhte Ausbeute von *rSPI* im Zelllysate. Daher erfolgte die Transformation von solchen *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen, die bereits das Plasmid pG-KJE8 trugen, mit pET-21a (+)_SPI. Codierende Gene für die Chaperone DnaK, DnaJ, GrpE, GroES sowie GroEL, die unter der Kontrolle des *araB*-(*dnaA*, *dnaJ*, *grpE*) bzw. *Pzt-1*-Promotors (*groES*, *groEL9*) stehen, liegen bei diesem System auf dem Plasmid pG-KJE8. Die Expression der Gene wird durch L-Arabinose bzw. Tetracyclin induziert. Allerdings wurde auch auf diese Weise keine Produktsteigerung erzielt. Eine Variation der Induktormengen innerhalb der Herstellerangaben brachte ebenfalls keine Erhöhung der löslichen Proteinmenge im Zelllysate (alle Nachweise durch SDS-PAGE; Daten nicht gezeigt).

Da sich im Verlauf der gesamten Untersuchung zusätzlich zeigte, dass das exprimierte Protein keine Inhibitoraktivität gegenüber Papain aufwies, wurde von diesem Produktionssystem Abstand genommen.

3.2.2. Vermeidung der Bildung von Proteinaggregaten

Die Nutzungshäufigkeit von Nukleotidtripletts differiert innerhalb verschiedener Spezies stark. Zur Verbesserung der Translationseffizienz durch

E. coli wurde von der Firma GenScript, New Jersey, die Codon-Nutzung für das *spi*-Gen anhand der Aminosäuresequenz optimiert (im Folgenden nur noch als *spi*_{opt} bezeichnet). Die Einführung einer His₆-codierenden Sequenz am 3'-Ende des Gens ermöglichte eine einfache Aufreinigung des Translationsprodukts mittels IMAC auch bei Nutzung von solchen Vektoren, die von Herstellerseite keinen so codierenden Abschnitt aufweisen. Diese *downstream*-Verlängerungen führten jedoch wegen des resultierenden Tripeptid-Linkers (Gly-Leu-Glu) gefolgt vom Hexahistidintag zu einer Molmassenzunahme von ca. 10% im Vergleich zum Wildtyp-Protein (13.3 zu 12.0 kDa).

In den vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Produktion von *rSPI* große Mengen an unlöslichem Proteinaggregat lieferte. Daher wurde angenommen, dass der verwendete T7-Promotor eine zu starke Expression des Gens verursacht und die Zeit für eine korrekte Faltung des Proteins nicht ausreicht. Die damit verbundene Akkumulation fehlgefalteter Proteine führt in der Folge zur Ausbildung unlöslicher Einschlusskörper (EK).

Der von der Firma Zedira GmbH, Darmstadt, bezogene Vektor pJOE2702 weist einen durch Rhamnose induzierbaren *rhaP*-Promotor auf, dessen Aktivitätsstärke unter der des T7-Promotors liegt, wodurch mehr Zeit für die korrekte Faltung zur Verfügung steht. Die Translationseffizienz des Gens *spi*_{opt} sollte durch die optimierten Codons verbessert werden.

Die beschriebene Temperaturstabilität des SPI ließ auf das Vorhandensein von mindestens einer Cystinbrücke schließen (Sarafeddinov *et al.*, 2011). Aus diesem Grund erfolgte die Transformation des Expressionsstamms *E. coli* SHuffle® der Firma New England Biolabs, Ipswich, mit dem Plasmid. Dieser Stamm exprimiert chromosomal die Disulfidbrückenisomerase DsbC, was eine Ausbildung der Brücken im cytoplasmatischen Raum möglich macht (Bessette *et al.*, 1999; Levy *et al.*, 2001). Hierdurch sollte eine korrekte Faltung des Proteins gewährleistet werden. Zusätzlich wurde die Inkubationstemperatur vor der Induktion auf 20 °C gesenkt.

Ein Nachweis des Proteins gelang sowohl im Zelllysat als auch in der Fraktion der EK (Abb. 24), jedoch ließ sich abermals keine Inhibitoraktivität

feststellen. Daraus wurde geschlossen, dass weiterhin kein korrekt gefaltetes Protein vorlag, oder zumindest dessen Menge unterhalb der Nachweisgrenze lag. Aus diesen Gründen wurde dieses Produktionsverfahren ebenfalls eingestellt.

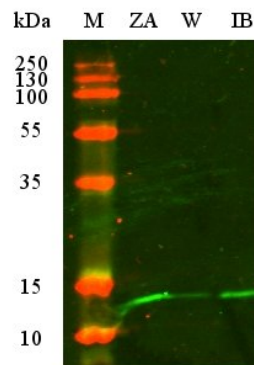


Abb. 24: Western Blot-Analyse der rekombinanten Produktion von SPI-His₆ in *E. coli* Shuffle® mit Anti-His₆-IgG: Die Produktion von SPI-His₆ erfolgte mit pJOE2702 und *E. coli* SHuffle in 100 ml LB-Medium bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5, die Induktion bei 20 °C durch Zugabe 0.5% Rhamnose für 4 h. Die Resuspendierung des Zellpellets erfolgte in 0.25 g ml⁻¹ 50 mM Tris-Acetat, pH 6.0, der Zellaufschluss durch dreimaliges Sonieren (30 sek, 50% Amplitude, 0.5 sek Puls, 0.5 sek Pause), das Waschen der Zelltrümmer mit 10 ml g⁻¹ Wasch-Puffer (100 mM Kaliumphosphat pH 8, 1% (w/v) Natriumdeoxycholat, 1 M Harnstoff, 10% (w/v) Glycerin, 2 mM EDTA) sowie die Resuspendierung der Einschlusskörper mit 10 ml g⁻¹ EK-Resuspendierungspuffer (8 M Harnstoff, 10 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM di-Natriumhydrogenphosphat). Die Elektrophorese sowie die Western Blot-Analyse erfolgten wie im Methodenteil beschrieben. M = Proteinstandard, Auftragungsvolumen: 5 µl; ZA = Zellaufschluss-Überstand; W = Waschpuffer-Überstand; IB = Einschlusskörper-Resuspension; Auftragungsvolumen je 25 µl

3.2.3. Produktion von rSPI ins Periplasma

Die SPI-Produktion mit pET-22b (+) ermöglicht die Fusion *upstream* des *spi*_{opt}-Gens mit einer Sequenz, die für ein degeneriertes Signalpeptid einer Pektatlyase B (*pelB*) von *Erwinia carotovora* codiert (Lei *et al.*, 1987), sowie *downstream* mit einem hexahistidincodierenden Abschnitt. Durch das N-terminale Signalpeptid erfolgt eine Sekretion des Proteins ins Periplasma (Le Calvez *et al.*, 1996), wo aufgrund der oxidativen Umgebung eine Ausbildung der Disulfidbrücken auch in solchen *E. coli*-Stämmen möglich ist, die cytoplasmatisch keine entsprechenden Enzyme besitzen. Wegen der periplasmatischen Sekretion des Proteins erfolgte der Zellaufschluss durch osmotischen Schock in zwei Schritten. Erst durch Behandlung des Zellpellets

mit dem zweiten Puffer (Osmosepuffer B) kommt es zum endgültigen Zellaufschluss (LaVallie *et al.*, 1993). Nach Vektorherstellerangaben sollte für Arbeiten mit pET-22b (+) auf pLysS-enthaltende *E. coli*-Zellen verzichtet werden, da das T7-Lysozym das Aufbrechen der inneren Membran während des osmotischen Schocks zur Folge hat und der Aufschluss damit bereits während der Inkubation mit Osmosepuffer A erfolgen kann. Daher wurde für die folgenden Untersuchungen der Expressionsstamm *E. coli* BL21-CodonPlus® (DE3) RIL der Firma Stratagene gewählt.

Der Nachweis über Western Blot-Analyse mit Anti-His₆-IgG (Daten nicht gezeigt) zeigte, dass das SPI-His₆-Fusionsprotein zwar auch im Überstand nach der Behandlung mit Osmosepuffer A vorhanden war, es sich aber überwiegend im Osmosepuffer B-Überstand nachweisen und hier auch mittels IMAC isolieren ließ. Papainaktivitätstests, bei denen die inhibitorische Aktivität indirekt darüber bestimmt, dass Papain gehemmt wird und in der Folge die Proteolyse von Azocasein reduziert ist, hingegen zeigten weiterhin keine Inhibition.

Georgiou und Valax beschrieben einen positiven Einfluss von reduziertem Glutathion auf die korrekte Faltung rekombinant-produzierter Proteine mit Disulfidbrücken im Periplasma (Georgiou und Valax, 1996). Aus diesem Grund wurde bei einer erneuten Produktion 5 mM Glutathion zusammen mit dem Induktor der Submerskultur nach dem Abkühlen auf 20 °C zugegeben. Der auf diese Weise in einer 100 ml-Submerskultur hergestellte rSPI-His₆ zeigte erstmals eine Inhibitoraktivität von 10-15% gegenüber Papain (Abb. 25). Somit stellt nachfolgend ein niedriger Wert der Proteaseaktivität eine starke Inhibition dar. Die Ergebnisse ließen sich jedoch nicht reproduzieren und auch nicht in einen größeren Maßstab übertragen.

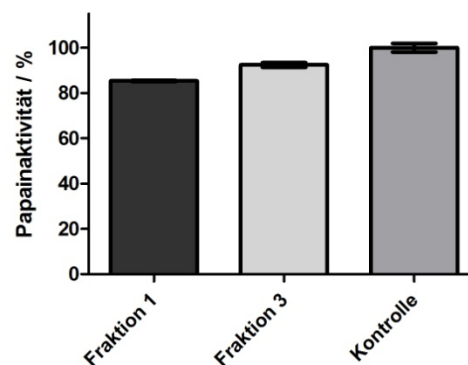


Abb. 25: Restaktivität von Papain in Gegenwart von *r*SPI-His₆ mit reduziertem Glutathion in der Kulturbrühe: Die Produktion von *r*SPI-His₆ erfolgte mit pET-22b (+) und *E. coli* BL21 CodonPlus® (DE3) RIL in 100 ml LB-Medium bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5, die Induktion bei 20 °C durch Zugabe 1 mM IPTG und 5 mM reduziertem Glutathion. Nach weiteren 4 h wurde SPI aus dem Überstand der aufgeschlossenen Zellmasse extrahiert und mittels IMAC (0-1 M Imidazol in 50 mM Tris-Acetat) bei pH 6.0 gereinigt. Die Bestimmung der Papainrestaktivität erfolgte durch Vorinkubation von 100 µl 25 µM Papain und 100 µl der jeweiligen Elutionsfraktion bei 37 °C für 10 min, gefolgt von einer Zugabe von 200 µl 1% (w/v) Azocasein in 100 mM Citrat, pH 6.5 und weiterer Inkubation für 60 min bei 37 °C. Durch Zugabe von 600 µl 10% (w/v) Trichloressigsäure wurde die Reaktion abgebrochen und die Papainaktivität anhand der A₄₂₀ bestimmt. Dargestellt ist die relative Papainaktivität normiert auf das ungehemmte Enzym (Kontrolle). Die Auswahl der eingesetzten Fraktionen erfolgte nach der Bandenstärke einer vorherigen SDS-PAGE (Daten nicht gezeigt). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (N = 3) an.

Folgeuntersuchungen wurden mit dem Ziel vorgenommen, die Aktivität von SPI durch Oxidation der Cysteinreste nachträglich herzustellen. Zu diesem Zweck wurde das Protein in 2 l LB-Medium erneut produziert, gereinigt und im Aktivitätstest charakterisiert. Wiederum konnte keine Inhibitoraktivität nachgewiesen werden. Deshalb wurden IMAC-Fractionen, die eine entsprechende SPI-Bande in der SDS-PAGE zeigten, vereinigt, mit 6 ml 50 mM Tris-Acetat, pH 6.0, verdünnt, um die Imidazolkonzentration zu senken, und erneut an IMAC-Material gebunden. Aliquots von 2.5 ml wurden mit jeweils 2 mM DTT, DTE, Mercaptoethanol und reduziertem Glutathion über Nacht bei 4 °C inkubiert und abschließend zur Stoßelution des Zielproteins mit 200 mM Imidazol in 50 mM Tris-Acetat pH 6.0 behandelt. Hierbei zeigten nur die Proben mit DTT und DTE eine Inhibition, während β -Mercaptoethanol und Glutathion eine erhöhte Papainaktivität hervorriefen (Abb. 26).

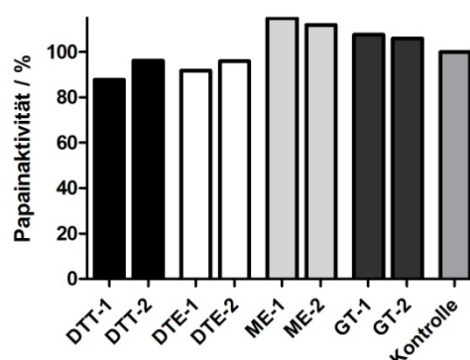


Abb. 26: Restaktivität von Papain in Gegenwart von thiolaktiviertem rSPI: Kultivierung (2 l LB-Medium), Zellernte und -aufschluss von *E. coli* erfolgten wie unter Abb. 25 beschrieben. Die proteinenthaltenden Proben wurden nach IMAC-Bindung mit je 2 mM DTT, DTE, Mercaptoethanol (ME) oder Glutathion (GT) bei 4 °C ü. N inkubiert und zweimal mit 125 µl 200 mM Imidazol in 50 mM Tris-Acetat, pH 6.0 stoßeluiert. Der Proteaseaktivitätstest wurde wie unter Abb. 25 beschrieben mit den jeweiligen Eluaten durchgeführt. Dargestellt ist die relative Papainaktivität normiert auf das ungehemmte Enzym (Kontrolle). N = 1

In vielen Arbeiten wird der Einsatz eines Redoxpuffers bestehend aus reduzierter und oxidierter Spezies eines organischen Moleküls für die Ausbildung von Cystinbrücken in rekombinant hergestellten Proteinen beschrieben (Fischer *et al.*, 1993). Aktivierungsversuche von IMAC-gebundenem Protein mit Glutathion in reduzierter und oxidierter Form im Verhältnis von 1:1 bis 1:0.1 bei pH 6.0 und pH 8.0 hatten keinen Einfluss auf die Aktivität von SPI (Abb. 27).

Da mit der heterologen Produktion von SPI mit keinem Plasmid, Produktionsstamm oder Additiv unter den verwendeten Produktionsbedingungen (Temperatur, pH, etc.) inhibitorisch aktives Protein nachweisbar war, wurde im Folgenden die zuvor nicht gewünschte intrazelluläre Herstellung von SPI in Form von Einschlusskörpern wieder aufgenommen. Diese beinhalten meist das Zielprotein in einer hohen Reinheit und sind gegenüber intrazellulären Proteasen resistent (Carrio *et al.*, 1998, 2000; Cubarsi *et al.*, 2001). Außerdem kann die Menge an Protein gesteigert werden. Nachteilig ist die notwendige Faltung zum aktiven Protein, auch wenn zahlreiche Verfahren dafür beschrieben sind.

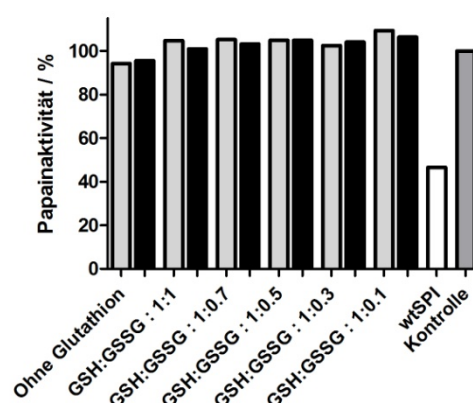


Abb. 27: Restaktivität von Papain in Gegenwart von glutathionaktiviertem *r*SPI: Kultivierung (1 l LB-Medium), Zellernte und -aufschluss von *E. coli* erfolgten wie unter Abb. 25 beschrieben. Die proteinenthaltenden Proben wurden nach IMAC-Bindung mit 2 mM reduziertem (GSH) und variablen Mengen oxidiertem Glutathion (GSSG) bei pH 6.0 (hellgrau) und pH 8.0 (schwarz) bei 4 °C ü.N. inkubiert und mit 200 µl 200 mM Imidazol in 50 mM Tris-Acetat, pH 6.0 stoßeluiert. Der Proteaseaktivitätstest wurde wie unter Abb. 25 beschrieben mit den jeweiligen Eluaten durchgeführt. Als Referenz diente 100 µl 0.75 µM wtSPI. Dargestellt ist die relative Papainaktivität normiert auf das ungehemmte Enzym (Kontrolle). N = 1

3.2.4. Rückfaltung von *r*SPI aus Einschlusskörpern

Vorhergehende Untersuchungen zeigten, dass mittels keinem der angewandten Verfahren für *r*SPI eine inhibitorische Aktivität reproduzierbar nachweisbar war. Die Ursache hierfür könnte darin liegen, dass die Menge an korrekt gefaltetem Protein unterhalb der Nachweisgrenze des Aktivitätstests lag. Die gezielte Produktion von rekombinanten Proteinen in Einschlusskörper (EK) kann eine Steigerung der Proteinmenge zur Folge haben, da dieses durch Aggregation akkumuliert und in relativ reiner Form isoliert werden kann. Jedoch muss das Protein nach der Isolation renaturiert werden, was den kritischen Punkt dieser Methodik darstellt.

Für die gezielte Produktion des Papaininhibitors in Einschlusskörpern wurde weiterhin der bereits beschriebene Vektor pET-22b (+) sowie der Produktionsstamm *E. coli* BL21-CodonPlus® (DE3) RIL verwendet. Um jedoch einen Transport des Proteins ins Periplasma auszuschließen, wurde das Signalpeptid-codierende *peIB*-Gen aus dem Vektor enzymatisch entfernt und dadurch das Translationsprodukt des einklonierten *spi_{opt}*-Gens mit C-terminalen Hexahistidintag im Cytoplasma verblieb (nachfolgend weiterhin als SPI-His₆

bezeichnet). Da dieses Protein wegen des C-terminalen Nonapeptids (Tripeptid-Linker plus Hexahistidintag) jedoch eine um ca. 10% größere Molmasse als die wt-Sequenz aufwies (13.3 zu 12.0 kDa), konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es aufgrund der Erweiterung zu Fehlfaltung und Reduktion von Inhibitoraktivität kommt. Aus diesem Grund wurde zusätzlich durch Punktmutation gezielt an das 3'-Ende des *spi*-Gens ein Stoppcodon eingefügt, so dass die Primärstruktur des Proteins der wt-Sequenz entsprach (im Folgenden nur noch als SPI-Stopp bezeichnet).

3.2.4.1. Bestimmung der optimalen Faltungsparameter

Für die Rückfaltung von denaturierten Proteinen aus EK sind verschiedene Methoden wie Dialyse, Gelfiltration oder Verdünnung beschrieben. Ebenso sind die Einflüsse von Parametern wie pH, Faltungsdauer und -temperatur auf jedes zu faltende Protein unterschiedlich (Fischer *et al.*, 1993). Daher mussten im Vorfeld einer Produktion im größeren Maßstab diese Einflüsse untersucht werden. Die folgenden Rückfaltungsuntersuchungen wurden durch Verdünnen von 0.5 ml EK-Resuspension in 25 ml Rückfaltungspuffer durchgeführt.

Da nicht bekannt war, bei welchem pH SPI am besten faltet, wurden EK-Suspensionen in Puffern mit pH 4.0 bis 9.0 verdünnt, die zur Ausbildung der erwarteten Disulfidbrücken reduziertes und oxidiertes Glutathion enthielten. Da ebenso nichts darüber bekannt war, wie lange die Faltung brauchen würde, wurden die Ansätze jeweils ein und drei Tage inkubiert. Als zusätzliches Selektionskriterium für nativen SPI wurden die verdünnten Proteinlösungen für 60 min auf 80 °C erhitzt, um fehlgefalteten SPI sowie Proteine des Wirtsstamms abzutrennen. Die Qualifizierung der Faltung erfolgte durch Bestimmung der Papainaktivität (Abb. 28).

Es konnte gezeigt werden, dass sich bei saurem pH ab pH 6.0 signifikant aktiver SPI mit einer inhibitorischen Aktivität von 5-15% nachweisen ließ. Ebenso zeigte sich, dass eine Inkubation über drei Tage eine höhere Inhibitoraktivität ergab. Da sich dieses Ergebnis jedoch in weiteren

Untersuchungen nicht bestätigte, wurde im Folgenden auf eine Verlängerung der Inkubationszeit verzichtet (Daten nicht gezeigt).

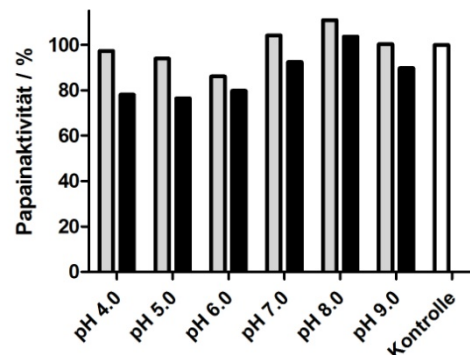


Abb. 28: Restaktivität von Papain in Gegenwart von aus Einschlusskörpern rückgefaltetem rSPI: Kultivierung (1 l LB-Medium), Zellernte und -aufschluss von *E. coli* erfolgten wie unter Abb. 25 beschrieben, jedoch mit andauernder Kultivierung nach der Induktion bei 37 °C schüttelnd ü.N. Die Präparation der Proteinaggregate erfolgte wie im Methodenteil beschrieben. Die Rückfaltung des Proteins erfolgte durch Verdünnung von 0.5 ml EK-Resuspension in je 25 ml 50 mM Acetat, pH 4.0 und pH 5.0, 50 mM Tris-Acetat, pH 6.0 und 50 mM Tris-HCl, pH 7.0 bis 9.0, versetzt mit 2 mM reduziertem und 0.2 mM oxidiertem Glutathion und anschließender Inkubation für 1 d (grau) bzw. 3 d (schwarz) rollend bei 4 °C. Reinigung und Konzentrierung erfolgten mit je 0.3 g Fractogel EMD SO₃⁻ im Batchverfahren, die Elution mit 300 µl 100 mM Citrat, pH 6.5, 1 M NaCl per Stoßelution. Der Proteaseaktivitätstest wurde wie unter Abb. 25 beschrieben mit den jeweiligen Eluaten durchgeführt. Dargestellt ist die relative Papainaktivität normiert auf das ungehemmte Enzym (Kontrolle). N =1

Die Verdünnung von denaturiertem SPI in Faltungspuffer zeigte bei saurem pH die Ausbildung von Präzipitat. Proteinaggregate können u.A. durch DNA verunreinigt sein (Fischer *et al.*, 1993), welche mit dem Zielprotein interagiert. Kommt es im Verlauf der Verdünnung zu einer DNA-Präzipitation, so fällt das Protein ebenfalls aus der Lösung aus. Um dies zu vermeiden, wurde noch während der EK-Präparation eine zweimalige DNA-Hydrolyse mit DNaseI durchgeführt. Zur Unterstützung der Zelllyse und zum Abbau von ggf. vorhandenen Membranbestandteilen wurde gleichzeitig Lysozym zugesetzt. Um zusätzlich die Adsorption von DNA-Fragmenten an SPI zu verhindern, wurde nach der EK-Präparation die Proteinlösung auf 1.5 M NaCl eingestellt sowie für 20 min im Ultraschallbad inkubiert. Die Rückfaltung der denaturierten Inhibitorproteine erfolgte abschließend basierend auf den vorhergehenden Untersuchungen nur noch bei pH 4.0-6.0 ü.N.

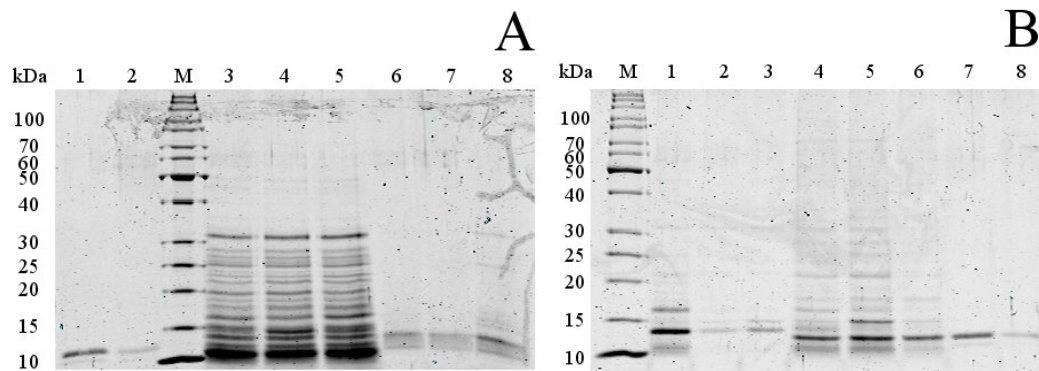


Abb. 29: Proteinmuster von aus EK rückgefaltetem *rSPI*: Kultivierung (0.5 l LB-Medium), Zellernte und -aufschluss von *E. coli* sowie die Präparation der Proteinaggregate erfolgten wie unter Abb. 28 beschrieben. Zusätzlich wurde nach dem Zellaufschluss eine zweimalige Inkubation mit DNaseI und Lysozym (B) wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt, die Proben vor der Faltung mit 1.5 M NaCl versetzt und im Ultraschallbad für 20 min inkubiert. Die Rückfaltung erfolgte durch Verdünnung von 0.66 ml EK-Resuspension mit NaCl in 25 ml Faltungspuffer wie unter Abb. 28 beschrieben. Die weitere Proteinreinigung erfolgte durch Erhitzen der verdünnten SPI-Lösung auf 80 °C und KIC (A: Spur 3 – 5; B: Spur 4 – 6) oder IMAC (A: Spur 6 – 8; B: Spur 1 – 3). Elektrophorese und Coomassie-Färbung erfolgten wie im Methodenteil beschrieben. M = Proteinstandard, Auftragungsvolumen 15 µl 1:5 verdünnt; Spur 3A/4B: SPI-Stopp gefaltet bei pH 4.0; Spur 4A/5B: SPI-Stopp, pH 5.0; Spur 5A/6B: SPI-Stopp, pH 6.0; Spur 6A/1B: SPI-His, pH 4.0; Spur 7A/2B: SPI-His, pH 5.0; Spur 8A/3B: SPI-His, pH 6.0; Spur 1A/7B: wtSPI, 2.5 µM; Spur 2A/8B: wtSPI, 0.75 µM; Auftragungsvolumen je 20 µl.

Durch die zusätzlichen Schritte zur Vermeidung von DNA-Protein-Interaktionen konnte eine deutliche Verbesserung bezüglich der Reinheit des Proteins nach der Chromatographie erreicht werden (Abb. 29). Speziell an der Reduktion der Intensität der Bande oberhalb von 10 kDa, bei der es sich vermutlich um einen Bestandteil aus dem Wirtsorganismus handelte, konnte dies festgemacht werden. Zusätzlich war visuell eine Verminderung der Präzipitation während der Verdünnung festzustellen. Die weiterführende Qualifizierung des Inhibitors erfolgte erneut mittels Papainaktivitätstest (Abb. 30).

Es konnte gezeigt werden, dass das Protein weiterhin eine inhibitorische Aktivität aufwies, die im Vergleich zur Rückfaltung ohne vorhergehenden DNaseI-/Lysozymverdau (Abb. 28) deutlich erhöht war. Allerdings war die Inhibition erheblich niedriger als die des Wildtyp-Proteins (wt). Eine semiquantitative Abschätzung der Bandenintensität von Abb. 29 legte eine Konzentration von 2.5 µM des *rSPI* nahe. Diese Menge des wt-Inhibitors reduziert die Papainaktivität auf 5%, wohingegen mit dem rekombinanten

Inhibitor eine Restaktivität von 70-80% verblieb. Dies war jedoch auch zu erwarten, da grundsätzlich wegen Fehlfaltung des Proteins (Abb. 8) nur eine geringe Ausbeute an aktivem Protein erzielt wird. Insgesamt zeigte sich, dass sich unter Verwendung eines Faltungspuffers bei pH 4.0 die besten Ergebnisse erzielen ließen, weswegen die Faltung im Folgenden nur noch bei diesem pH durchgeführt wurde.

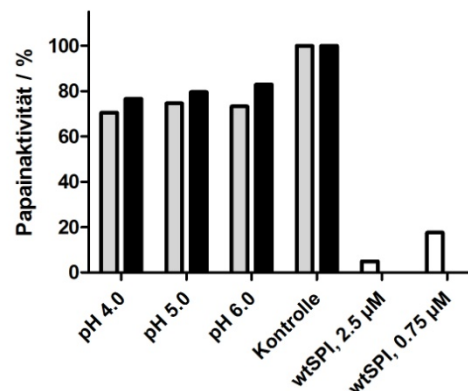


Abb. 30: Restaktivität von Papain in Gegenwart von aus EK rückgefaltetem *r*SPI nach DNaseI-/Lysozymverdau, NaCl-Zusatz und Ultraschallinkubation: Präparation und Rückfaltung der Proteinaggregate erfolgten wie unter Abb. 29B beschrieben. Die weitere Proteinreinigung erfolgte durch Erhitzen der verdünnten SPI-Lösung auf 80 °C und KIC oder IMAC. Der Proteaseaktivitätstest wurde wie unter Abb. 25 beschrieben mit den jeweiligen Eluat (grau = SPI-Stopp, schwarz = SPI-His) durchgeführt. Als Referenz dienten je 100 µl 2.5 µM und 0.75 µM *wt*SPI. Dargestellt ist die relative Papainaktivität normiert auf das ungehemmte Enzym (Kontrolle). N = 1

Um die optimale Temperatur für die Faltung festzustellen, wurde die verdünnte Mischung bei 4 °C, 28 °C und 37 °C ü.N. unter Bewegung inkubiert, und anschließend der Inhibitor im Papainaktivitätstest charakterisiert (Abb. 31).

Hierbei zeigte sich, dass SPI-Stopp, der bei 4 °C rückgefaltet wurde, mit ca. 18% Inhibition die höchste Aktivität aufwies. SPI-His₆ hingegen zeigte mit ca. 12% Inhibition die höchste Aktivität, wenn das Protein bei 37 °C gefaltet wurde. Da jedoch die Unterschiede der SPI-His₆-Aktivitäten geringer waren als die von SPI-Stopp, wurde im Folgenden dauerhaft bei 4 °C inkubiert. Tendenziell hatte das Protein mit mutmaßlicher *wt*-Sequenz eine höhere Aktivität als die um den His-Tag verlängerte Version. Da die beiden Proteine sich im Verlauf der Faltung, Reinigung und Extraktion annähernd gleich verhielten (Nachweis mittels SDS-PAGE; Daten nicht gezeigt), wurden im Folgenden sowohl für das

markierte als auch für das Protein mit wt-Sequenz dieselben Parameter während der Rückfaltung verwendet.

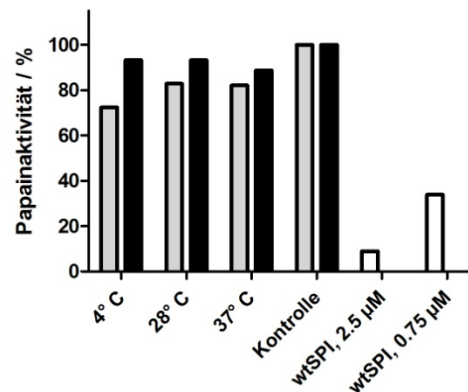
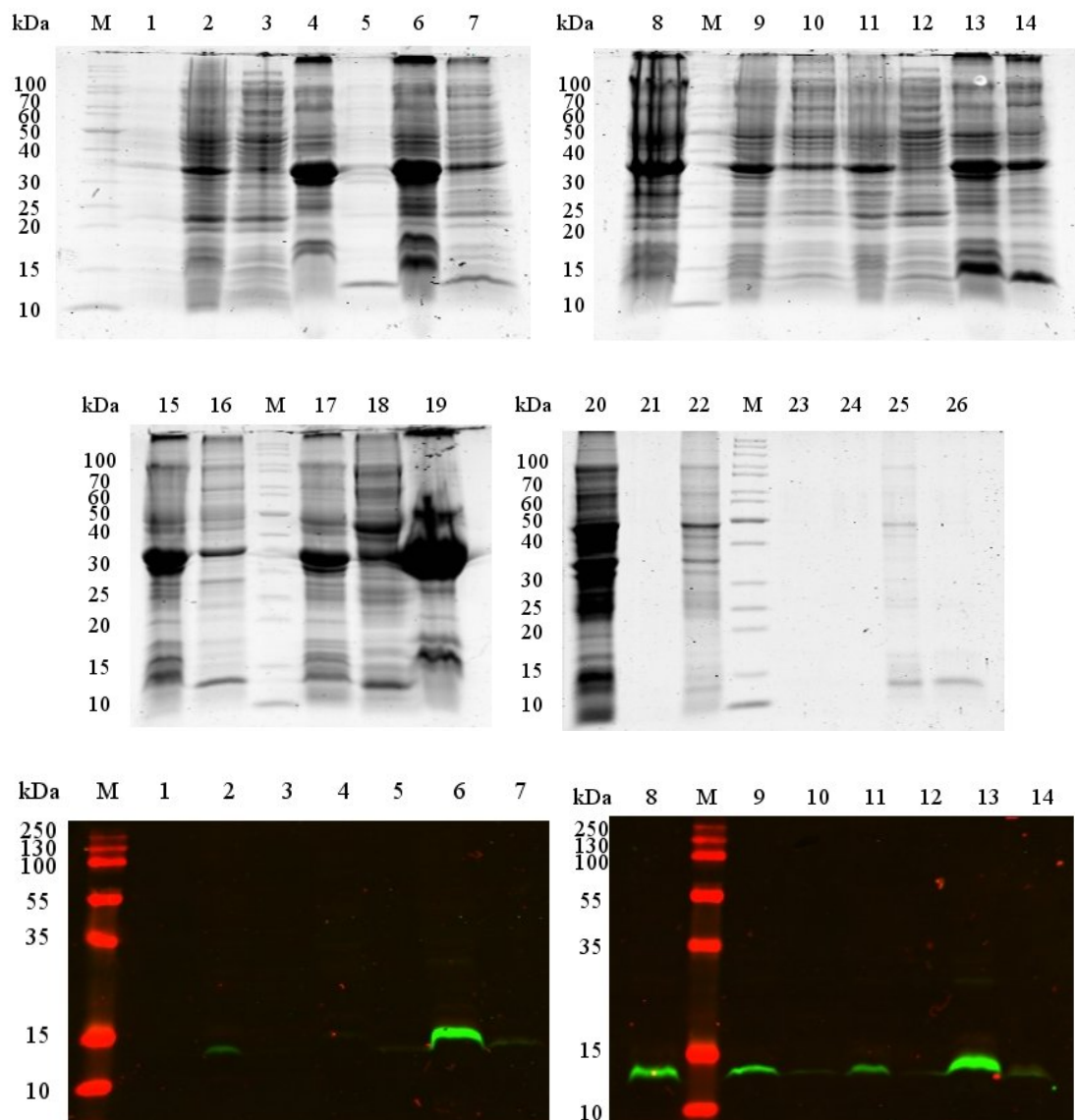


Abb. 31: Restaktivität von Papain in Gegenwart von aus EK bei variablen Temperaturen rückgefaltetem *r*SPI: Präparation und Rückfaltung der Proteinaggregate erfolgten wie unter Abb. 29B beschrieben, jedoch ausschließlich in 50 mM Acetat, pH 4.0 und es wurde die Faltungstemperatur variiert. Die weitere Proteinreinigung erfolgte durch Erhitzen der verdünnten SPI-Lösung auf 80 °C und KIC oder IMAC. Der Proteaseaktivitätstest wurde wie unter Abb. 25 beschrieben mit den jeweiligen Eluaten (grau = SPI-Stopp, schwarz = SPI-His) durchgeführt. Als Referenz dienten je 100 µl 2.5 µM und 0.75 µM *wt*SPI. Dargestellt ist die relative Papainaktivität normiert auf das ungehemmte Enzym (Kontrolle). N =1

Zur Bestimmung der Verteilung von SPI-His₆ während des gesamten Produktionsvorgangs von der Expression bis hin zum rückgefalteten Protein wurde eine SDS-PAGE mit anschließender Western Blot-Analyse mit Anti-His₆ IgG durchgeführt (Abb. 32). Da sich die Strukturen der *r*SPI-Varianten nur durch den His-Tag unterschieden und beide Varianten in vorhergehenden Untersuchungen ähnliches Verhalten aufwiesen, gab das Ergebnis auch Hinweise auf die Verteilung des Proteins ohne His-Tag.

Hierbei zeigte sich, dass das Protein bei allen Verfahrensschritten überwiegend in der Fraktion lokalisiert vorlag, die im jeweils folgenden Schritt weiter aufgearbeitet wurde. Schon in vorhergehenden Untersuchungen fiel auf, dass das Zellpellet nach dem ersten Waschen mit EK-Waschpuffer mit einer hochviskosen Schicht überzogen war, wodurch eine Abnahme des Überstands extrem erschwert wurde. Innerhalb dieser Schicht konnte ebenfalls Protein nachgewiesen werden (Abb. 32, Spur 8). Gleichzeitig zeigte sich, dass aus den EK der Inhibitor nahezu vollständig extrahiert werden konnte, und nur noch sehr wenig SPI nachweislich in der dauerhaft unlöslichen Fraktion verblieb (Spur 18

bzw. 19). Ebenso konnte bestätigt werden, dass zwar bereits durch die Verdünnung mit Rückfaltungspuffer ein Teil der Proteine präzipitierte (Spur 20), jedoch die verbleibenden Moleküle schon die für den Wildtyp nachgewiesene Hitzestabilität aufwiesen (Sarafeddinov *et al.*, 2011) und während der folgenden einstündigen Inkubation bei 80 °C keine weitere Fällung zu beobachten war (kein Signal in Spur 22).



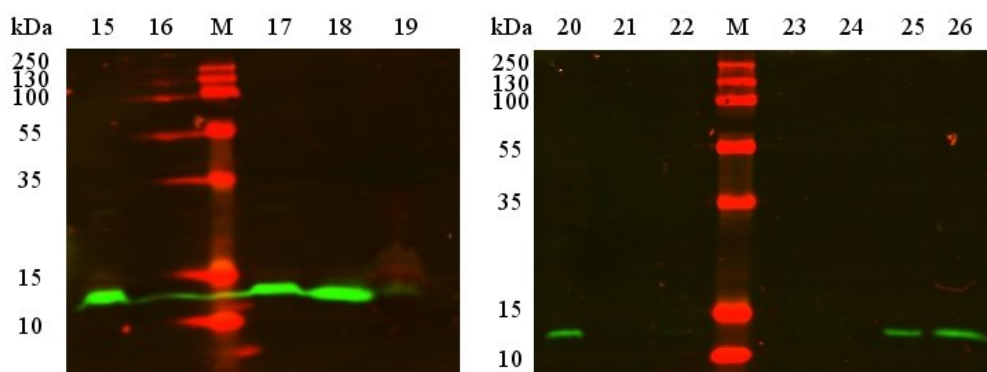


Abb. 32: SDS-PAGE (oben) und Western Blot (unten) der Produktion, EK-Präparation und Rückfaltung von *rSPI-His₆*: Kultivierung (1 l LB-Medium), Zellernte und -aufschluss von *E. coli* sowie die Präparation der Proteinaggregate und Rückfaltung des rekombinanten Proteins erfolgten wie unter Abb. 31 beschrieben. Die weitere Proteinreinigung erfolgte durch Erhitzen der verdünnten SPI-Lösung auf 80 °C und KIC. Elektrophorese und Western Blot-Analyse mit Anti-His₆ IgG erfolgten wie im Methodenteil beschrieben. M = Proteinstandard, Auftragsvolumen 15 µl, 1:5 verdünnt (unstained Ladder) bzw. 5 µl (prestained Ladder); Spur 1 = Kulturbrühe Überstand; Spur 2 = Zellpellet; Spur 3 = Lysatüberstand; Spur 4 = Lysatpellet; Spur 5 = DNase I-/Lysozym-Verdau 1-Überstand; Spur 6 = DNase I-/Lysozym-Verdau 1-Pellet; Spur 7 = Waschschrift 1-Überstand; Spur 8 = Waschschrift 1 (viskose Schicht); Spur 9 = Waschschrift 1-Pellet; Spur 10 = Waschschrift 2-Überstand; Spur 11 = Waschschrift 2-Pellet; Spur 12 = DNase I-/Lysozym-Verdau 2-Überstand; Spur 13 = DNase I-/Lysozym-Verdau 2-Pellet; Spur 14 = Waschschrift 3-Überstand; Spur 15 = Waschschrift 3-Pellet; Spur 16 = Waschschrift 4-Überstand; Spur 17 = Waschschrift 4-Pellet; Spur 18 = Inclusion Body-Resuspension; Spur 19 = Unlösliche Fraktion; Spur 20 = Faltungs-Pellet; Spur 21 = Faltungs-Überstand; Spur 22 = Koch-Pellet; Spur 23 = Koch-Überstand; Spur 24 = Sepharose-Überstand; Spur 25 = Sepharose-Pellet; Spur 26 = Eluat; Sämtliche Zentrifugationsüberstände (Spur 1, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 16, 18, 21, 23, 26) wurden 1:2 mit SDS-Auftragspuffer mit Mercaptoethanol versetzt, Auftragsvolumen: 25 µl; Sämtliche Zentrifugationspellets (Spur 2, 4, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 25) wurden mit 50 µl SDS-Auftragspuffer mit Mercaptoethanol überschichtet, Auftragsvolumen: 10 µl. Das Auftragsvolumen der Spur 8 betrug 15 µl

3.2.4.2. Produktion von *rSPI* in großen Volumina

Durch die Vorversuche waren die optimalen Faltungsbedingungen für die Parameter pH, Zeit und Temperatur bekannt. Weiterhin hatte SPI-His₆ die Verluste über den gesamten Produktionsweg angezeigt. Nun sollte abschließend die Anreicherung von aktivem SPI durch chromatographische Verfahren untersucht werden, um für nachfolgende Arbeiten das Protein mit hohem Reinheitsgrad und in aktiver Form gewinnen zu können. Nur so konnte die Übereinstimmung von *rSPI* mit *wSPI* überprüft werden, im Besonderen die Anwesenheit der für die Vernetzung mit Transglutaminase notwendigen Glutamin- und Lysinreste. Der präparative Faltungsansatz musste so gestaltet werden, dass mit den im Labor vorhandenen Anlagen eine entsprechende

Chromatographie durchführbar und das Protein nach der Elution noch nachweisbar war. Da davon ausgegangen wurde, dass sich faltungsbedingte Unterschiede innerhalb der Proteinstruktur hauptsächlich auf die Oberflächenladung auswirken, wurde zur Aufreinigung eine Kationenaustauschchromatographie (KIC) verwendet. Eine immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie (IMAC) erschien nicht als erfolgsversprechend, da die Komplexierung des Ni^{2+} durch das Hexahistidin wahrscheinlich von der Struktur des Proteins weniger stark beeinflusst wird.

Die Faltung von 20 ml denaturierter EK-Resuspension in 1 l Faltungspuffer erfolgte mittels Tropftrichter in einem 2 l 4-Schikanekolben auf einem Rundschüttler im Eisbad. So konnte eine größtmögliche Verdünnung und Temperierung gewährleistet werden. Die KIC erfolgte mit 30 g Fractogel- SO_3^- im Batch-Verfahren, die abschließende Elution in 50 mM Acetat, pH 4.0 mit linearem 0-1 M NaCl-Gradienten (Abb. 33). Anschließend wurde die Proteinmenge mittels BCA-Assay quantifiziert und die spezifische Inhibitoraktivität in einem Papainaktivitätstest bestimmt.

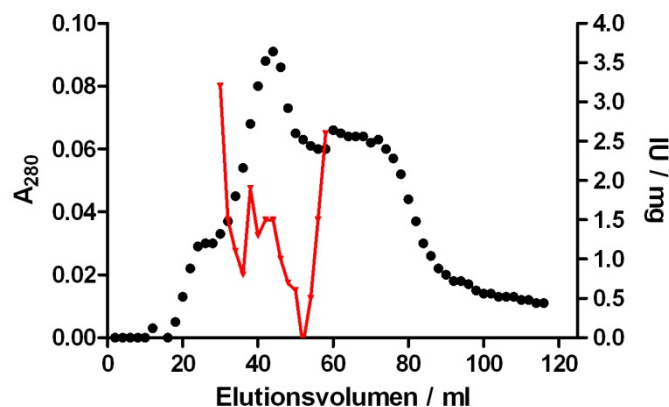


Abb. 33: Kationenaustauschchromatogramm und inhibitorische Aktivität von rSPI-Stopp im großen Ansatz: Kultivierung (2 l LB-Medium), Zellernte und -aufschluss von *E. coli* sowie die Präparation der Proteinaggregate erfolgten wie unter Abb. 29B beschrieben. Die Rückfaltung erfolgte durch tropfenweise Verdünnung von 20 ml EK-Resuspension in 1 l 50 mM Acetat, pH 4.0 versetzt mit 0.2 mM oxidiertem und 2 mM reduziertem Glutathion schüttelnd in einem 4-Schikanekolben und anschließender Inkubation rollend bei 4 °C ü.N. Die weitere Proteinreinigung erfolgte durch Erhitzen der verdünnten SPI-Lösung auf 80 °C und KIC. Die Elution der KIC-gebundenen Proteine erfolgte in 50 mM Acetat, pH 4.0 mit linearem 0-1 M NaCl-Gradient über 60 ml (nicht eingezeichnet). Der Proteaseaktivitätstest wurde wie unter Abb. 25 beschrieben mit den jeweiligen Eluaten durchgeführt. 1 IU (rot) entspricht einer Aktivitätsminderung um 0.1ΔE. N = 1

Im Aktivitätsverlauf über das Chromatogramm zeigte sich, dass keine direkte Korrelation zwischen Proteinmenge und spezifischer Inhibitoraktivität auszumachen war (Abb. 33). Hieraus konnte geschlossen werden, dass die unterschiedlichen Faltungsvarianten des Papaininhibitors tatsächlich auch unterschiedliche Oberflächenladungen aufweisen, wodurch es zu einer Trennung der verschiedenen Spezies kommt. Aus der einerseits relativ niedrigen Konzentration des Eluats zu Beginn, andererseits aber der ähnlich hohen Aktivität wie im Zentrum des Elutionspeaks, wurde geschlossen, dass die aktive Spezies bereits zu einem frühen Zeitpunkt von der Säule eluiert. Zusätzlich zeigte sich jedoch weiterhin, dass auch dieser *rSPI* bedeutend inaktiver ist als das direkt mit *S. mobaraensis* produzierte Wildtyp-Protein.

In der Folge wurden zahlreiche Versuche zur Erhöhung der Inhibitoraktivität durch Abtrennung inaktiver Varianten und Konzentrierung *via* KIC, IMAC, Dialyse, Zentrifugation und Lyophilisation ohne Erfolg unternommen. Auch eine nachträgliche Aktivierung des *rSPI* bei erhöhter Temperatur oder, in der Annahme eines fehlenden Faktors, durch Metallionen, Thiolreagenzien, *S. mobaraensis*-Kulturbrühe oder amphiphile Moleküle blieben ohne greifbares Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Ebenso konnte eine Reproduktion der oben gezeigten Ergebnisse nicht erreicht werden, wodurch es nicht gelang, ausreichend Protein für die angestrebte Charakterisierung des Proteins hinsichtlich seiner Transglutaminase-Bindeeigenschaften zu produzieren. Aus Untersuchungen mit *wtSPI* aus *S. mobaraensis* kam die Vermutung auf, dass das Protein einen Kofaktor benötigt, um aktiviert zu werden (siehe unten). Dies würde erklären, warum es nicht gelungen war, aktives Protein rekombinant zu produzieren und dieses reproduzierbar nachzuweisen. Gleichzeitig wurde eine toxische Wirkung des *wt*-Proteins auf den Wirtsstamm *E. coli* BL21-CodonPlus® (DE3) RIL festgestellt (siehe unten). Aus diesen Gründen wurde die Produktion von *rSPI* eingestellt.

3.3. Untersuchungen mit wtSPI von *S. mobaraensis*

Im Rahmen dieser Arbeit sollte neben der rekombinanten Produktion des SPI auch die Produktion, Aufreinigung und Charakterisierung des Wildtyp-Proteins verbessert werden. Als Grundlage diene das von Sarafeddinov *et al.* (2011) beschriebene Verfahren. Hierbei erfolgt die Kultivierung von *S. mobaraensis* bei 28 °C oder 42 °C für 30-50 Stunden. Durch Kultivierung bei 42 °C (thermischer Stress) kann der Export von TGase weitgehend unterdrückt werden. Weiterhin erlaubt es die große Hitzestabilität von SPI, die zellfreie Kulturbrühe für 30 min auf 70 °C zu erhitzen. Hierdurch wird der Großteil der Proteine bereits zu einem frühen Zeitpunkt abgetrennt, was die spätere Aufreinigung über Ionenaustauschchromatographie erleichtert (Sarafeddinov *et al.*, 2011). Da ein Ziel dieser Arbeit eine nähergehende Charakterisierung des Proteins auch hinsichtlich der TGase-Bindestellen war, musste eine frühzeitige Modifizierung von SPI durch Deamidierung der Glutaminseitenketten verhindert werden. Aus diesem Grund erfolgte die Kultivierung ausschließlich unter den genannten thermischen Stressbedingungen.

3.3.1. Bestimmung der optimalen Kultivierungsdauer

Transglutaminase wird als Zymogen exportiert, was die Vernetzung von Proteinen verhindert (Pasternack *et al.*, 1998). Die nachfolgende Prozessierung ist strikt reguliert (Zotzel *et al.*, 2003a, 2003b). Weiterhin wird SPI wie andere Substrate der TGase von *S. mobaraensis* in einer frühen Wachstumsphase sezerniert (Sarafeddinov *et al.*, 2011). Dadurch ermöglicht ein frühzeitiges Abernten die von TGase verursachte Hydrolyse von Glutaminseitenketten des SPI so gering wie möglich zu halten. Zur genauen Detektion der zeitlichen Aktivierung von TGase wurde *S. mobaraensis* über 24 h, 30 h und 40 h bei 42 °C kultiviert. Proenzym und reife TGase wurden nachfolgend in der zellfreien Kulturbrühe mittels Western Blot-Analyse nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Hierbei konnte gezeigt werden, dass bereits nach 24 Stunden sowohl das Zymogen als auch das reife Enzym vorhanden waren, deren Menge bei einer

40 h-Kultur aber nicht weiter zunahm. Demgegenüber war jedoch eine Verdopplung der SPI-Konzentration zu beobachten, weswegen die Kultivierung von *S. mobaraensis* über 40 h erfolgte.

3.3.2 Aufreinigung des wtSPI aus der Kulturbrühe

In den Arbeiten von Sarafeddinov *et al.* (2011) konnte gezeigt werden, dass SPI aus einer thermischen Stresskultur nur geringe Affinität zur Festphase der Kationenaustauschchromatographie, Fractogel EMD SO_3^- , aufwies. Ebenfalls zeigte sich, dass das gebundene Protein durch lineare Erhöhung der NaCl-Konzentration von 0 M auf 1 M breit von der Säule eluierte (Sarafeddinov *et al.*, 2011). Zur weiterführenden Charakterisierung war es daher entscheidend, die Reinigung des Proteins zu verbessern.

3.3.2.1. Vorreinigung der Kulturbrühe durch Temperatur

Das Reinigungsprotokoll nach Sarafeddinov *et al.* (2011) nutzt die Hitzestabilität des SPI dahingehend aus, dass die Kulturbrühe vor der Chromatographie für 30 min auf 70 °C erhitzt wurde. Sarafeddinov *et al.* (2011) stellten gleichzeitig fest, dass sowohl SPI als auch SSTI bei noch höherer Temperatur stabil bleiben. So zeigte SPI bei einer Inkubation über 1 h in Siedehitze nur einen Aktivitätsverlust von 30% (Sarafeddinov *et al.*, 2011). Aus diesem Grund wurde die Reinigungseffizienz nach Erhitzen der Kulturbrühe für 1 h auf 80 °C untersucht.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass durch Erhöhung von Temperatur und Verlängerung der Zeit auch der Reinigungserfolg moderat verbessert wurde (Daten nicht gezeigt). Da keine SPI-Verluste eintraten, wurden nachfolgende Submerskulturen nach der Zellernte stets für 1 h auf 80 °C erhitzt.

3.3.2.2. Vorreinigung der Kulturbrühe durch Abtrennung anionischer Bestandteile mittels Anionenaustauschchromatographie

Sarafeddinov *et al.* wiesen Oligoglutamate in der Submerskultur von *S. mobaraensis* nach, wenn dieser unter thermischem Stress kultiviert wurde. Diese kleinen, negativen Oligomere ($M \ll 10$ kDa) werden unter diesen Bedingungen vom Organismus anscheinend in großen Mengen produziert und verhindern die Adsorption des SPI an die stationäre Phase der KIC (Sarafeddinov *et al.*, 2011).

Um die störenden Komponenten abzutrennen, wurde die nach dem Erhitzen zentrifugierte Kulturbrühe über eine Anionenaustauschersäule mit Fractogel TMAE als stationäre Phase gepumpt. Auf diese Weise konnten die Oligoglutamate aus der Kulturbrühe entfernt und die im Vorlauf enthaltenen Proteine nachfolgend über eine KIC weiter aufgereinigt werden.

3.3.3. Konzentration und Konservierung von SPI über Dialyse und Lyophilisation

Nach der Reinigung über die beschriebenen Verfahren wurden die KIC-Elutionsfraktionen nach Reinheit und Inhibitoraktivität vereinigt, und das Protein zur weiteren Konzentrierung und Konservierung durch eine Membran mit einer Ausschlussgrenze von 3 500 Da gegen Wasser dialysiert und lyophilisiert. Dabei verlor das Protein vollständig seine inhibitorische Aktivität (Abb. 34). Untersuchungen zeigten, dass die Inaktivierung von SPI durch die Dialyse und nicht die Lyophilisation verursacht wurde.

Da die Dialysemembran ein Ausschlussgrenze von 3 500 Da hatte und sich gleichzeitig das Laufverhalten des nativen und des dialysierten Proteins (nachfolgend als nSPI und dSPI bezeichnet) in der SDS-PAGE nicht voneinander unterschieden (Daten nicht gezeigt), wurde angenommen, dass durch die große Verdünnung ein Kofaktor vom Protein abgetrennt wurde. Dieses Molekül wäre relativ klein und könnte für die inhibitorische Aktivität

durch Stabilisierung der Proteinkonformation verantwortlich sein. Ebenso könnte jedoch auch jener Faktor selbst die Aktivitätsminderung der Protease hervorrufen. Das Vorhandensein eines Kofaktors steht im Einklang mit der Domänen-Zuordnung des Proteins, in dessen letzten Drittel durch Homologieabgleich eine *double-psi beta barrel*-Domäne identifiziert wurde (Abb. 23). Diese Domäne bindet häufig Kofaktoren (Castillo *et al.*, 1999). Der gesuchte Faktor muss weiterhin eine sehr hohe Affinität zu SPI haben, da weder für SSTI, DAIP, TGase, TAMEP oder PTP-SM eine inhibitorische Aktivität gegen Cysteinproteasen nachgewiesen werden konnte. Da jedoch unklar war, welcher Natur dieser Faktor sein würde, wurden im Folgenden Substanzen mit unterschiedlichen Eigenschaften auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die inhibitorische Wirkung von dSPI wieder herzustellen.

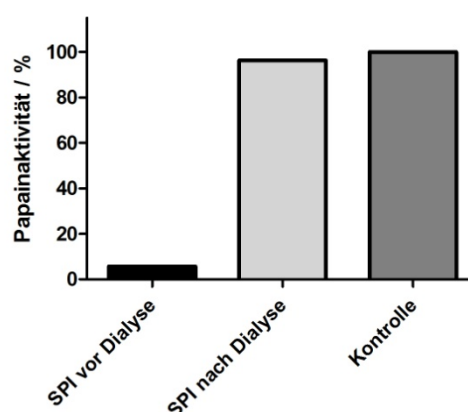


Abb. 34: Restaktivität von Papain in Gegenwart von wtSPI vor und nach der Dialyse: *S. mobaraensis* wurde 40 h bei 42 °C schüttelnd inkubiert. Nach der Zellernte wurde der Überstand für 60 min auf 80 °C erhitzt, zentrifugiert, durch AIC und zweifacher KIC aufgetrennt und durch eine 3 500 Da-Membran gegen Wasser dialysiert. Zur Bestimmung der Proteaseaktivität wurden 100 µl 10 µM dSPI und nSPI eingesetzt. Die SPI-Aktivität wurde wie unter Abb. 25 beschrieben ermittelt. Dargestellt ist die relative Papainaktivität normiert auf das ungehemmte Enzym (Kontrolle). N = 1

3.3.3.1. Versuche zur Reaktivierung von dSPI mit Natriumchlorid

Die Kulturmedien für das Wachstum von *S. mobaraensis* auf Agarplatten oder in Schüttelkolben enthalten 1 g l⁻¹ NaCl. Zusätzlich wird SPI bei der chromatographischen Reinigung mit NaCl eluiert, das hohe Löslichkeit und Stabilität vieler Proteine garantiert. Aus diesem Grund sollte nachfolgend

untersucht werden, ob durch den Entzug von NaCl während der Dialyse SPI eine Konformationsänderung erfährt, die den Verlust der Aktivität erklärt. Hierzu wurde dSPI mit NaCl unterschiedlicher Konzentration über 15 min bei 37 °C vorinkubiert und anschließend auf Aktivität mit Papain untersucht (Abb. 35).

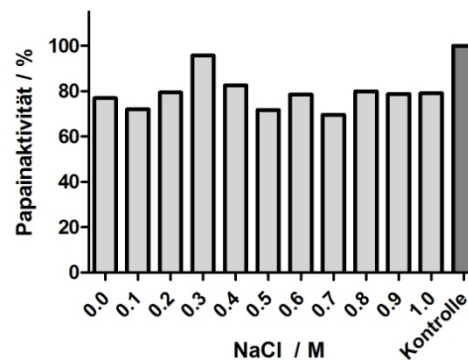


Abb. 35: Aktivität von dSPI gegen Papain nach Inkubation mit NaCl: Die Produktion erfolgte wie unter Abb. 34 beschrieben. Vor Bestimmung der Inhibitoraktivität wurden 7.35 μ M SPI in 50 mM Acetat pH 4.0 mit den angegebenen NaCl-Konzentrationen (Endvolumen von 100 μ l) für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die anschließende Bestimmung der Proteaseaktivität erfolgte wie unter Abb. 25 beschrieben. Dargestellt ist die relative Papainaktivität normiert auf das ungehemmte Enzym (Kontrolle). N = 1

Hierbei zeigte sich, dass keine der untersuchten NaCl-Konzentrationen einen Effekt auf die inhibitorische Aktivität von dSPI hatte. Daraus konnte geschlossen werden, dass der Verlust der inhibitorischen Aktivität nicht durch Konformationsänderung bei Entzug von Na^+ - oder Cl^- -Ionen entsteht. Ebenfalls konnte ausgeschlossen werden, dass ein anderes Alkalimetall- oder Halogenidion das Protein stabilisiert, weil diese bei der chromatographischen Elution mit hoher Wahrscheinlichkeit durch Na^+ oder Cl^- ersetzt worden wären. Daher wurde nachfolgend der Effekt von bivalenten Kationen auf das Protein untersucht.

3.3.3.2. Versuche zur Reaktivierung von dSPI mit bivalenten Kationen

Bivalente Kationen sind häufig essenziell für Struktur und Funktion eines Proteins. So sind Zn^{2+} -Ionen an der Ausbildung des Aktivzentrums von Metalloproteasen beteiligt, Ca^{2+} -Ionen hingegen stabilisieren häufig die Proteinkonformation. Für die Submerskultivierung von *S. mobaraensis* wird

neben C- und N-Quellen noch eine Spurenelementlösung nach Voelskow zugesetzt (1981). Dieses Gemisch enthält verschiedene Metallsalze, die für das bakterielle Wachstum und die Proteinproduktion wichtig sind.

SPI besitzt keine proteolytische Aktivität. Ob das Protein jedoch stabilisierende Kationen für die korrekte Ausbildung und Aufrechterhaltung seiner Konformation benötigt, war bisher unklar. Um die Wirkung der in der Spurenelementlösung enthaltenen Kationen zu untersuchen, wurde nSPI einerseits gegen 10 mM Acetat, pH 5.0, mit 10 mM EDTA und andererseits nur gegen 10 mM Acetat, pH 5.0, dialysiert. Nach Entfernen von EDTA durch eine zweite Dialyse erfolgte die Inkubation des so erhaltenen dSPI mit 1 mM der Erdalkalimetallsalze Ca^{2+} und Mg^{2+} bzw. 50 μM der Übergangsmetallsalze Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Mo^{2+} und Zn^{2+} . Fe^{3+} war das einzige trivalente Kation. Die Inkubation des Proteins mit den jeweiligen Metalllösungen erfolgte über vier Tage bei 4 °C. Anschließend wurde die inhibitorische Aktivität gegen Papain bestimmt (Abb. 36)

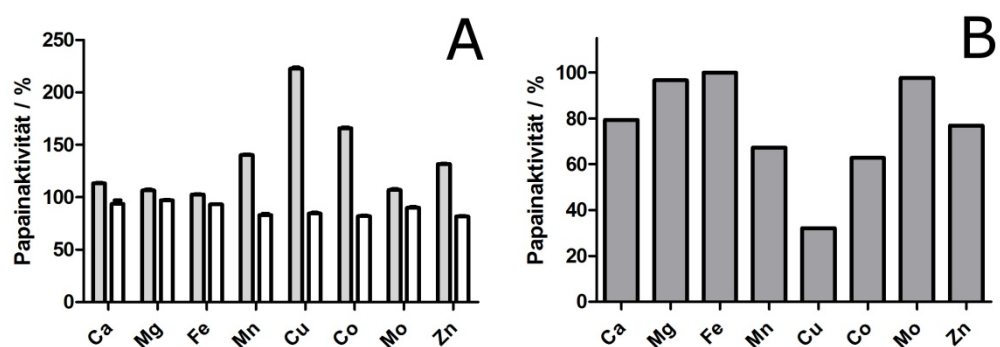


Abb. 36: Aktivität von dSPI gegen Papain nach Inkubation mit Metallionen: A. Produktion und Reinigung erfolgten wie zuvor beschrieben und durch Dialyse gegen 10 mM Acetat pH 4.0 mit (A, grau) und ohne (A, weiß) EDTA. EDTA behandelter dSPI (11.8 μM) oder dSPI (15.1 μM) wurde in 50 mM Acetat pH 4.0 mit 1 mM Ca oder Mg bzw 50 μM Fe, Mn, Cu, Co, Mo oder Zn für 4 d bei 4 °C vorinkubiert und auf Aktivität gegen Papain untersucht. B. Papainaktivität in Gegenwart der Metallionen von Versuch A. Die Bestimmung der Proteaseaktivität erfolgte wie unter Abb. 25 beschrieben. N = 3 (A), N = 1 (B)

Die Untersuchung zeigte, dass Papain von jedem Metall bis auf Eisen und Molybdän inaktiviert wurde (Abb. 36B). Die Proteaseaktivität nach der Inkubation mit metallbehandeltem dSPI blieb hingegen unverändert oder wurde sogar dramatisch erhöht (Abb. 36A). Besonders hoch war die Papainaktivität, wenn SPI gegen EDTA/Acetat dialysiert und mit Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} oder Zn^{2+}

vorinkubiert war. Der Effekt blieb unklar. Möglicherweise schützte entmetallisierter SPI Papain durch Abfangen der Ionen mit den vorhandenen Cysteinresten, wobei verbleibende Thiolate die Aktivität der Protease steigerten. Von Transglutaminase ist bekannt, dass das Enzym durch Dimerisierung über das einzige Cystein im Aktivzentrum inaktiviert wird. Dieser Effekt ist durch Zugabe kleiner Mengen Thiolreagenzien umkehrbar, wodurch es zu einer Reaktivierung des Enzyms kommt (Gebauer, 2010). Um den Effekt von Thiolreagenzien auf Papain zu untersuchen, wurde im Folgenden die Proteaseaktivität in Gegenwart verschiedener Thiolreagenzien bestimmt (Abb. 37).

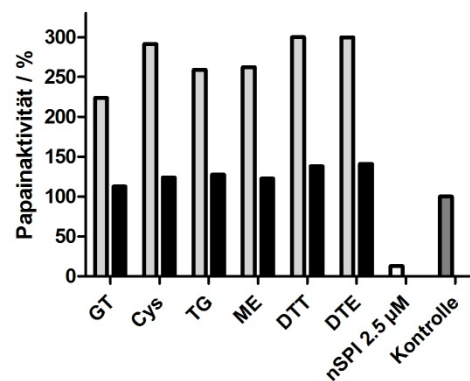


Abb. 37: Aktivität von Papain in Gegenwart verschiedener Thiolreagenzien: 100 µl 25 µM Papain wurden mit 100 µl 1 mM (hellgrau) bzw. 2.5 µM (schwarz) Glutathion (GT), Cystein (Cys), Thioglycerin (TG), β-Mercaptoethanol (ME), Dithiothreitol (DTT) und Dithioerythritol (DTE) für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Bestimmung der Proteaseaktivität erfolgte wie unter Abb. 25 beschrieben. Als Referenz dienten 100 µl 2.5 µM nSPI. Dargestellt ist die relative Papainaktivität normiert auf das ungehemmte Enzym (Kontrolle). N = 1

Hierbei bestätigten sich die vorangegangenen Überlegungen. Die Konzentration der Thiolreagenzien von 2.5 µM, die der dSPI-Menge im Inhibitionsansatz entsprach, aktivierte Papain in ähnlicher Größenordnung (Abb. 36). Wurde die Konzentration von 1 mM gewählt, stieg die Papainaktivität sogar auf das Dreifache. Durch diese Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem gesuchten mutmaßlichen Kofaktor weder um ein bivalentes Metallion noch um eine Thiolkomponente handeln konnte.

3.3.3.3. Versuche zur Reaktivierung von dSPI mit amphiphilen Molekülen

Die in der AG Fuchsbauer favorisierte Hypothese schreibt den Proteaseinhibitoren eine physiologische Funktion als Schutzschild gegen proteolytisch aktive Enzyme koexistierender Bakterien und Pilze zu (Sarafeddin *et al.*, 2011). Hierzu werden sie in die hydrophobe Hülle der Lufthyphen eingebaut und auf der hydrophilen Seite von Transglutaminase vernetzt. Um ein Austrocknen der Hyphen zu verhindern, ist zusätzlich der Einbau von kleinen amphiphilen Molekülen denkbar, die die Zwischenräume der Proteine abdichten und verschließen. Gleichzeitig könnten amphiphile Moleküle wie Lipoaminosäuren oder Lipopolyamine als Kofaktor dienen, indem sie kryptische Glutamin- und Lysinreste für die Vernetzung von Transglutaminase exponieren. Dies war der Grund, weshalb im Folgenden die Reaktivierung von dSPI mit unterschiedlichen amphiphilen Molekülen untersucht wurde (Abb. 38).

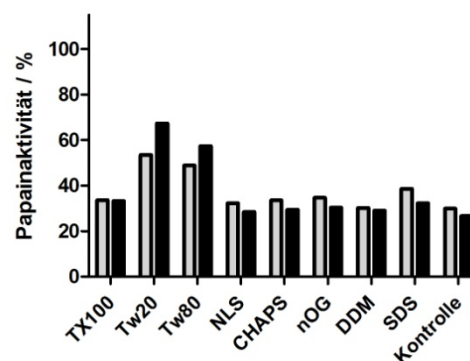


Abb. 38: Aktivität von Papain in Gegenwart von mit amphiphilen Molekülen inkubiertem nSPI und dSPI: Die Produktion erfolgte wie unter Abb. 34 beschrieben. nSPI (0.6 μ M, grau) und dSPI (6 μ M, schwarz) wurden für 1 h bei 37 °C mit 1 mM Triton X-100 (TX100), Tween20 (Tw20), Tween80 (Tw80), N-Lauroylsarcosin (NLS), 3-[3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat (CHAPS), n-Octyl- β -D-glucopyranosid (nOG), Dodecyl- β -D-maltosid (DDM), Natriumdodecylsulfat (SDS) bzw. ohne Detergenz (Kontrolle) vorinkubiert (Detergenzkonzentration im Reaktionsansatz). Die Bestimmung der Proteaseaktivität erfolgte wie unter Abb. 25 beschrieben. Dargestellt ist die relative Proteaseaktivität jeweils normiert auf Papain ohne SPI, jedoch mit derselben Menge amphiphilen Moleküls inkubiert. Da jede Aktivitätsbestimmung einer eigenen Positivkontrolle ohne Detergenz unterzogen wurde, sind diese Daten hier nicht gezeigt. N = 1

Die Untersuchungen erbrachten erneut keine Reaktivierung von dSPI. Kein amphiphiles Molekül konnte die Inhibitoraktivität von nSPI und dSPI gegenüber

der Kontrolle steigern, wobei die um eine Größenordnung unterschiedliche Konzentration der SPI-Varianten zu beachten ist (Abb. 38). Die Mischungen mit Tween20 und Tween80 zeigten eine höhere Papainaktivität an, was auf eine Denaturierung von nSPI schließen lässt. Insgesamt ergab auch diese Versuchsreihe, dass der gesuchte Kofaktor kein amphiphiles Molekül ist.

3.3.3.4. Versuche zur Reaktivierung von dSPI mit filtrierter Kulturbrühe von *S. mobaraensis*

Nach Ausschluss verschiedener anorganischer und organischer Verbindungen als potentielle Kofaktoren sollte nachfolgend die Kulturbrühe von *S. mobaraensis* auf eine aktivierende Substanz hin untersucht werden. Hierzu wurden Proteine einer 40 h-Stresskultur, darunter SPI, über einen Zentrifugenfilter mit einer Ausschlussgrenze von 3 000 Da entfernt. Hierdurch sollte sichergestellt werden, dass alle nachfolgend festgestellten Effekte nicht durch SPI-Rückstände verfälscht wurden. Die erfolgreiche Abtrennung der Proteine wurde über SDS-PAGE überprüft (Daten nicht gezeigt) und das so erhaltene Filtrat auf seine Wirkung auf Papain im Aktivitätstest hin untersucht (Abb. 39).

Im Verlauf der ersten Untersuchung mit unverdünntem Kulturbrühenfiltrat zeigte sich, dass dieses bereits einen großen inhibitorischen Einfluss auf die Papainaktivität hatte (Abb. 39A). Da das Filtrat kein SPI mehr enthielt, musste sich in dieser komplexen Zusammensetzung eine Substanz befinden, die ebenfalls die Cysteinprotease hemmt, oder aber der gesuchte Faktor wird zusätzlich zur Bindung an SPI ins Kulturmedium sekretiert. Um den Einfluss jener Substanz in weiteren Untersuchungen unter die Nachweisgrenze zu drücken, wurde Kulturbrühenfiltrat verdünnt und auf Restaktivität untersucht (Abb. 39B). Ab einer Verdünnung von 1:10 000 war keine Inhibition mehr festzustellen (Abb. 39B), weswegen im Folgenden das Filtrat in einer solchen Verdünnung als Reaktivierungsagensatz eingesetzt wurde. Es konnte jedoch auch mit dem verdünnten Filtrat keine Reaktivierung von dSPI ermittelt werden (Daten nicht gezeigt). Nachfolgend sollte untersucht werden, ob durch Kreispumpen von filtrierter Kulturbrühe durch eine mit Fractgel EMD SO_3^-

befüllte Säule immobilisierter dSPI aktiviert wird. Der Versuch scheiterte daran, dass die Bindung von dSPI an das Kationenaustauschermaterial nicht mehr gelang. Deshalb wurden die Reaktivierungsversuche mit proteinfreier Kulturbrühe an dieser Stelle beendet.

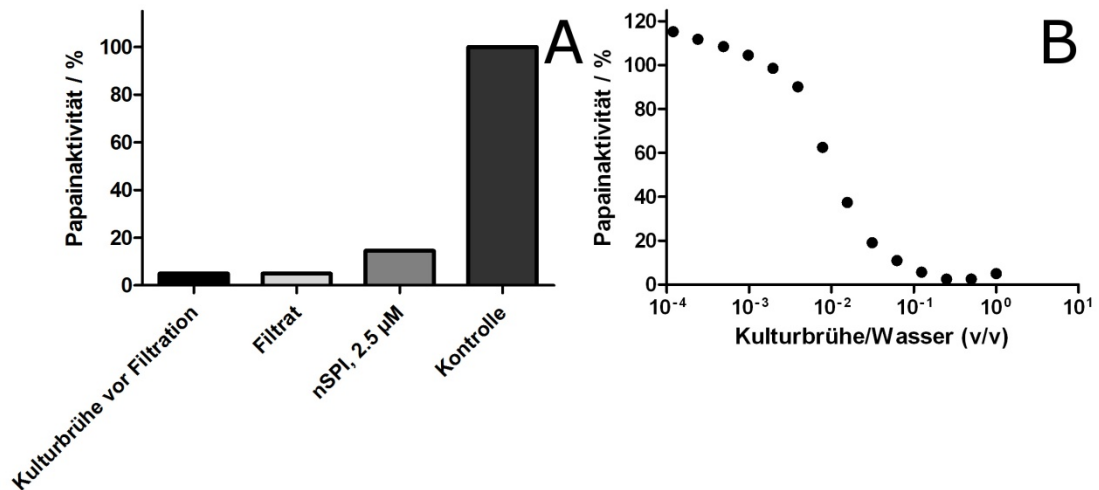


Abb. 39: Restaktivität von Papain in Gegenwart von *S. mobaraensis*-Kulturbrühenfiltrat in verschiedenen Verdünnungen: Die Kultivierung von *S. mobaraensis* erfolgte wie unter Abb. 34 beschrieben. Nach dem Erhitzen der Kulturbrühe für 1 h auf 80 °C wurden die Präzipitate durch Zentrifugation entfernt. Anschließend wurde der Überstand mehrfach für 20 min bei 12 000 x g über einen Vivaspin 2 mit einer Ausschlussgrenze von 3 000 Da zentrifugiert und 100 µl des Filtrats im Papainaktivitätstest wie unter Abb. 25 beschrieben unverdünnt (A) und in verschiedenen Verdünnungen (B) eingesetzt. Als Referenz dienten 100 µl 2.5 µM nSPI (A). Dargestellt ist die relative Papainaktivität normiert auf das ungehemmte Enzym (Kontrolle).

3.3.3.5. Reaktivierung der inhibitorischen Aktivität des dSPI durch Inkubation mit lyophilisiertem Dialysat

Im Verlauf der Dialyse gegen Wasser verliert SPI den Großteil seiner inhibitorischen Aktivität. Der Bicinchoninsäuretest zeigte in der Regel eine konstante Abnahme des Proteingehalts von ca. 75%. Diese Beobachtung legte nahe, dass der gesuchte Kofaktor in großen Mengen vorliegt oder ein hohes Reduktionspotential gegenüber Cu²⁺ im BCA-Test aufweist. Durch Dialyse von gereinigtem SPI gegen kleine Volumina Wasser und anschließender Lyophilisation des Dialysats sollte im Folgenden der Faktor gezielt isoliert und charakterisiert werden.

Zu diesem Zweck wurden dreimal 0.8 ml nSPI gegen je 25 ml Wasser ü.N. dialysiert, und das so erhaltene Dialysat wurde lyophilisiert. Da der Großteil des so erhaltenen Feststoffs aus Acetat und NaCl aus der KIC-Elution bestand wurde der Rückstand mit organischen Lösungsmitteln extrahiert. Dies erfolgte hintereinander dreimal mit je 200 µl Chloroform, dreimal mit je 200 µl Ethylacetat und dreimal mit je 200 µl Ethylacetat:Methanol 4:1 (v/v). Alle Auszüge sowie der Rückstand der letzten Extraktion wurden durch Lyophilisation getrocknet, in Wasser aufgenommen und abschließend in einem Papainaktivitätstest qualifiziert (Abb. 40).

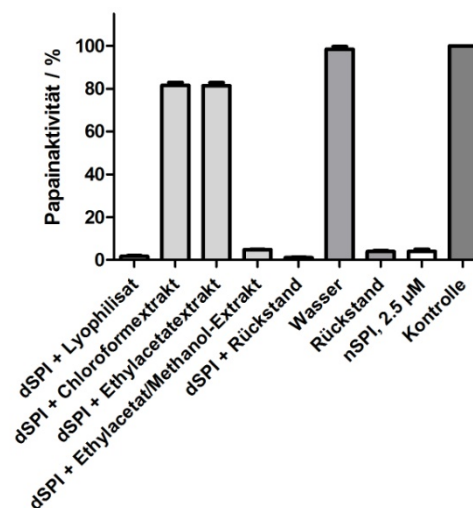


Abb. 40: Restaktivität von Papain in Gegenwart von dSPI-Dialysatextrakt-Mischungen:

Die Produktion von dSPI erfolgte wie unter Abb. 34 beschrieben. Der durch Lyophilisation der Dialysate erhaltene Feststoff wurde je dreimal mit je 200 µl Chloroform, Ethylacetat und Ethylacetat/Methanol 4:1 (v/v) extrahiert. Die Extrakte sowie der Rückstand wurden lyophilisiert und in 100 µl Wasser (Rückstand: 200 µl) resuspendiert. Die Bestimmung der Proteaseaktivität erfolgte wie unter Abb. 25 beschrieben mit je 20 µl 125 µM Papain, 100 µl 26 µM dSPI, 30 µl resuspendierter Extrakt/Rückstand, 18 µl 1 M Citrat, pH 6.5 sowie 32 µl Wasser. Als Referenzen dienten 30 µl Wasser anstelle von Dialyseextrakt-Mischung („Wasser“), 100 µl Wasser anstelle von dSPI („Rückstand“) und 100 µl 2.5 µl nSPI und 30 µl Wasser anstelle von dSPI und Dialysat-Extrakt. Dargestellt ist die relative Papainaktivität normiert auf das ungehemmte Enzym (Kontrolle). N = 3

Die Untersuchungsergebnisse deuteten eine Reaktivierung der Inhibitorwirkung des dSPI an, jedoch zeigte der Vergleich mit der Kontrolle „Rückstand“, bei der kein SPI vorhanden war, dass der inhibierende Effekt eindeutig vom Extrakt selbst und nicht vom Protein ausging.

Um zu bestätigen, dass der unbekannte Kofaktor die inhibitorische Aktivität verursachte, wurden im Folgenden drei verschiedenen konzentrierte nSPI *via* Dialyse in Apoprotein und Kofaktor getrennt und im Anschluss nSPI vor der Dialyse sowie beide Fraktionen nach der Dialyse in unabhängigen Versuchsreihen auf ihre inhibitorische Aktivität untersucht. Würde sich die Annahme bestätigen, dass die inhibitorische Aktivität von dem unbekannten Faktor und nicht vom Protein selbst ausgeht, so sollten die Dialysate bei gleicher eingesetzter Menge wie nSPI dieselben Papainrestaktivitäten ergeben.

500 µl 5 µM, 11 µM und 20 µM nSPI wurden jeweils in fünf Schritten gegen viermal 50 ml und einmal 200 ml Wasser dialysiert und die so erhaltenen Dialysate anschließend je Ursprungskonzentration wieder vereint und zur Konzentrierung bis zur Trockne lyophilisiert. Anschließend wurden die Dialysate wieder in 500 µl Wasser gelöst, um eine vergleichbare Konzentration des Faktors nach wie vor der Dialyse zu erhalten. Hierdurch war es im Anschluss möglich, die erhaltenen Daten direkt mit den entsprechend konzentrierten nSPI zu vergleichen.

Zur Bestimmung der inhibitorischen Aktivität wurde das resuspendierte Dialysat der dialysierten nSPI-Proben in einer Verdünnungsreihe im Papainaktivitätstest charakterisiert. Die eingesetzten Mengen Dialysat entsprachen hierbei exakt jenen Verdünnungen nicht-dialysierten nSPIs, die die angegebenen Konzentrationen besaßen (Abb. 41). Zusätzlich wurde die Aktivität von dSPI, der das verbleibende Apoprotein der drei untersuchten Konzentrationen darstellt, bestimmt. Da jedoch die Konzentration der dSPI-Proben unterhalb der Nachweisgrenze des BCA-Tests waren, wurden davon jeweils 100 µl als zusätzliche Referenz eingesetzt.

Die Untersuchungen zeigten, dass die inhibitorische Aktivität des nSPI sowie des resuspendiertem Dialysats zu jedem Zeitpunkt annähernd identisch war (Abb. 41A - C). Die Differenz von ungefähr 10% lässt sich über verbleibende inhibitorische Restaktivität von dSPI erklären (D). Diese dürfte sich vermutlich durch wiederholte oder verlängerte Dialyse bis auf Null absenken lassen.

Ebenfalls ließ sich zeigen, dass sowohl nSPI als auch Dialysat unabhängig von der Ausgangskonzentration die gleiche Inhibitorwirkung auf Papain hatten.

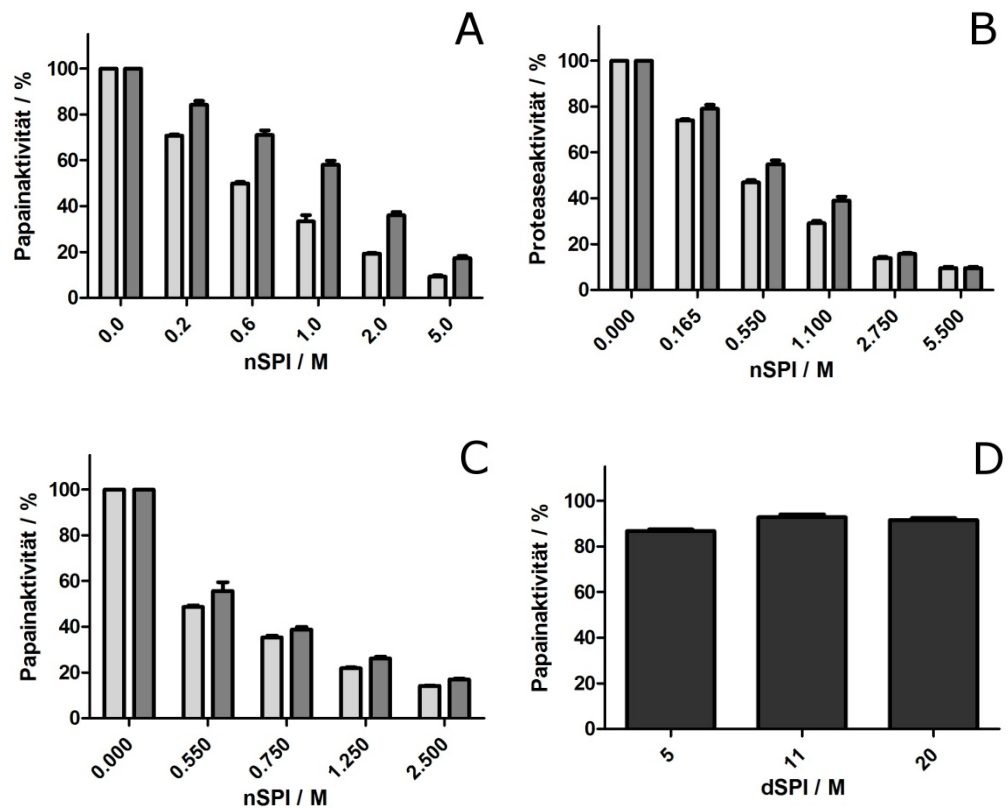


Abb. 41: Restaktivität von Papain in Gegenwart von nSPI und resuspendiertem Dialysat:

Die Produktion von dSPI erfolgte wie unter Abb. 34 beschrieben. 500 µl nSPI (20 µM (A), 11 µM (B) und 5 µM (C)) wurden gegen je 400 ml (portionsweise: 4x 50 ml, 1x 200 ml) Wasser über insgesamt 3 d dialysiert. Das Dialysat wurde lyophilisiert und anschließend in 500 µl Wasser resuspendiert. Die Bestimmung der Proteaseaktivität erfolgte wie unter Abb. 25 beschrieben. Das resuspendierte Dialysat (grau) wurde analog des nSPI (hellgrau) verdünnt, um die dieselbe Stoffkonzentration zu erhalten. Zusätzlich wurde dSPI (D, dunkelgrau), der durch Dialyse der angegebenen nSPI-Konzentrationen erhalten wurde, untersucht. Dargestellt ist die relative Proteaseaktivität normiert auf das ungehemmte Enzym. N = 3

Es konnte somit zweifelsfrei gezeigt werden, dass sich die inhibitorischen Aktivität von SPI durch Dialyse entfernen ließ. Damit war der Beweis erbracht, dass nicht das Protein selbst sondern ein unbekannter Faktor für den inhibitorischen Effekt von nSPI verantwortlich ist.

3.3.3.6. Charakterisierung des Kofaktors

Nachdem zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte, dass sich nSPI aus einem Protein mit Bindestellen für Transglutaminase und einem

papaininhibierenden Kofaktor zusammensetzt, sollte der Faktor näher charakterisiert werden. Aus den vorhergehenden Untersuchungen ging klar hervor, dass es sich bei dem gesuchten Faktor um ein vergleichbar kleines Molekül handeln musste. Dieses passierte einerseits eine 3 500 kDa-Membran, und andererseits unterschieden sich das Laufverhalten von nSPI und dSPI in einem SDS-Gel nicht voneinander. Daher sollte die nähere Charakterisierung über HPLC-ESI-MS erfolgen.

Hierzu wurden das Dialysat wie oben beschrieben nach der Trocknung mit Chloroform, Ethylacetat und Ethylacetat/Methanol 4:1 (v/v) extrahiert. Wässriges Dialysat und Ethylacetat/Methanol-Extrakt, die Papain stark hemmten, wurden massenspektrometrisch untersucht (Abb. 40, Abb. 42A und B).

Die Untersuchungen zeigten einen Reinigungseffekt über die verschiedenen Extraktionsschritte. So waren im Spektrum des Dialysats neben zwei Hauptmassen mit m/z von 782.5 und 1310.1 noch viele andere Verbindungen mit relativ intensiven Massenpeaks zu sehen (Abb. 42A), während das Spektrum des Ethylacetat/Methanol-Extrakts im Wesentlichen nur eine Substanz mit m/z von 685.6 anzeigte (B). Unklar war, ob die Verbindung des Extrakts (B) ebenfalls im Spektrum des Dialysats (A) vorkommt oder ob es sich hierbei um das Fragment einer Verbindung mit größerer Molmasse handelte.

Die Analyse ergab, dass alle genannten Molmassen von einfach geladenen Moleküle stammten. Dies ist jedoch der einzige Hinweis, der im Rahmen dieser Arbeit auf dieser Grundlage hinsichtlich der Struktur gemacht werden konnte. Die Untersuchungen bewiesen lediglich, dass es sich bei dem gesuchten Stoff um ein relativ großes organisches Molekül handeln musste.

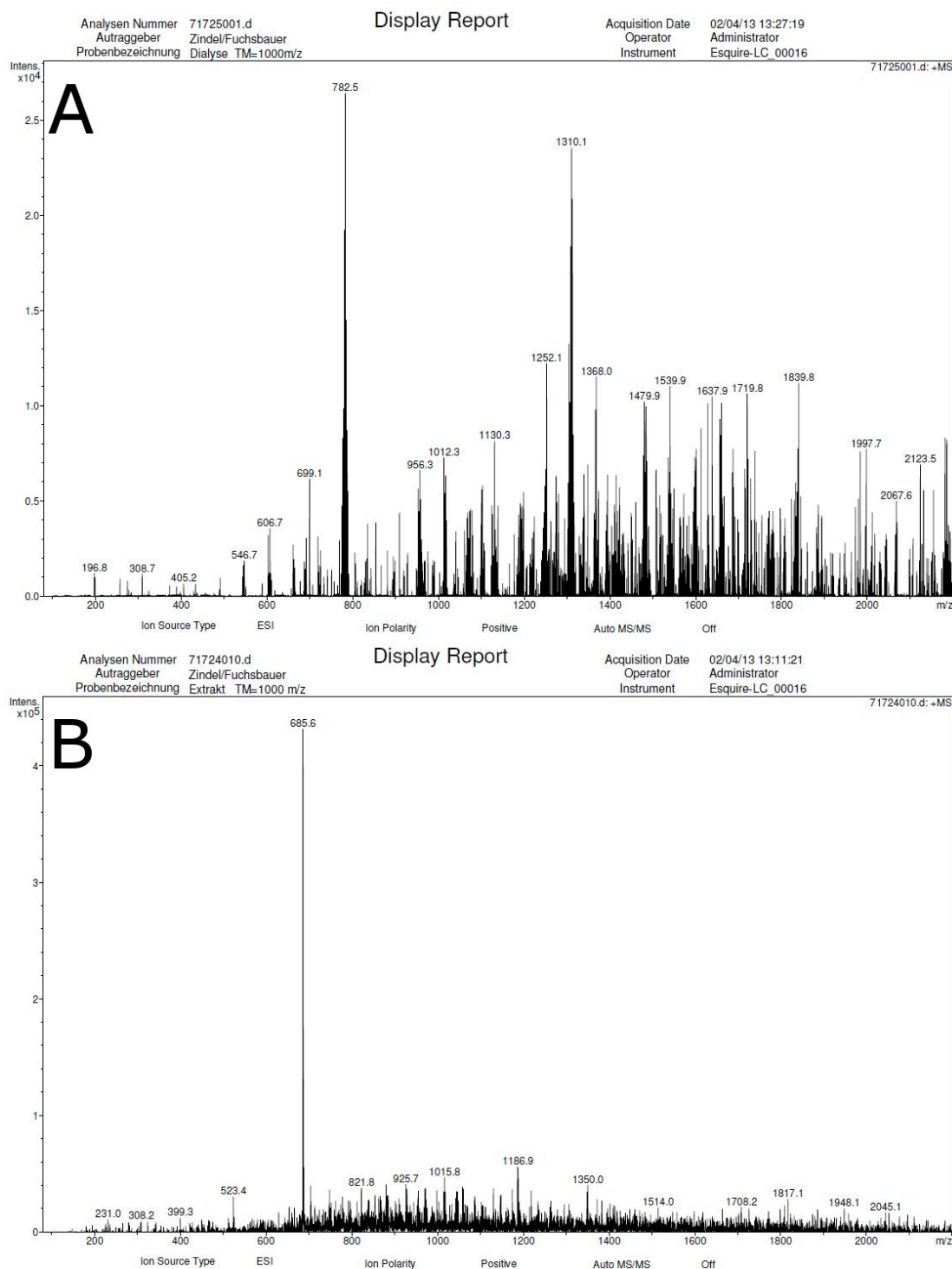


Abb. 42: HPLC-ESI-Massenspektrum des papaininhibierenden Kofaktors von SPI nach der Dialyse (A) und nach der Extraktion (B): Die Produktion von dSPI erfolgte wie unter Abb. 34 beschrieben. Die Dialyse und Trocknung sowie die Extraktion des Dialysats erfolgten wie unter Abb. 40 beschrieben. Die massenspektrometrischen Untersuchungen erfolgten am Esquire-LC_00016 in der MS-Abteilung der TU Darmstadt als positives Massenspektrum.

3.4. Klassifizierung von SPI

Nachdem durch vorhergehende Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass die inhibitorische Aktivität gegen Cysteinproteasen nicht von SPI selbst, sondern von einem adsorptiv gebundenen Faktor ausgeht, wurde mit bioinformatischen Methoden nach Strukturverwandschaft zu anderen Proteinen gesucht, um ggf. eine weitere biologische Funktion zu entdecken. Zu diesem Zweck wurde über den *Protein Homology/Analogy Recognition Engine 2-Server* (PHYRE2; www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/; Kelley und Sternberg, 2009) auf Grundlage der Aminosäuresequenz eine Vorhersage der Sekundärstrukturen vorgenommen (Abb. 43A). Durch ein Onlinealignment mit Kristallstrukturen, die in der *Protein Data Base* (PDB) enthalten sind, konnte mit derselben Software ein Modell für den konkreten Aufbau des Proteins erstellt und mit Hilfe der Software Chimera 1.4.1 visualisiert werden (Abb. 43B).

Durch Berechnung der Sekundärstrukturen lassen sich für SPI drei α -Helices und sechs β -Faltblätter vorhersagen, wobei die erste α -Helix größtenteils auf die h-Region des Signalpeptids entfällt und somit durch Prozessierung bei der Plasmamembranpassage entfernt wird. Sie ist aus diesem Grund in Abb. 43 nicht gezeigt. Weiterhin bestätigt die mutmaßliche Tertiärstruktur die nach Sequenzabgleich mit der *Conserved Data Base* (Abb. 23) ermittelte *double-psi beta barrel*-Domäne (DPBB). Allerdings erstreckt sich bei diesem Modell die DPBB-Domäne über das gesamte Protein und nicht nur über das letzte Drittel wie nach dem Abgleich der Primärstruktur.

Auch hinsichtlich der möglichen Bindestellen für Transglutaminase ließen sich anhand dieses Modells weitere, rein hypothetische Aussagen treffen. Schmidt *et al.* konnten zeigen, dass durch Inkubation von TGase-Substraten mit N-Lauroylsarcosin bzw. einem Lipopolyamid solche Proteine markierbar sind, die ohne den Zusatz keine Reaktion zeigten. Daraus wurde geschlossen, dass die genannten Verbindungen zwischen H- bzw. Salzbrücken interkalieren und dadurch bisher unzugängliche Glutamin- bzw. Lysinreste für eine Reaktion mit TGase zur Verfügung stellen (Schmidt *et al.*, 2008).

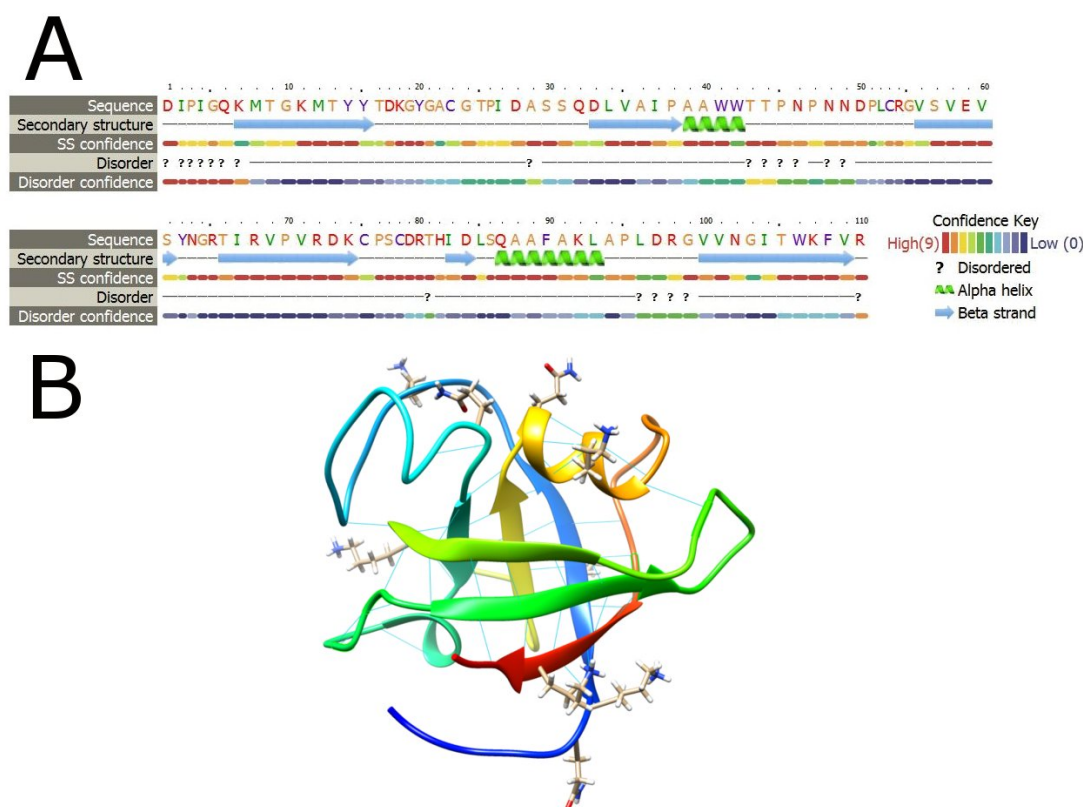


Abb. 43: Vorhersage der putativen Sekundär- (A) und Tertiärstrukturen (B) des SPI von *S. mobaraensis*: A: Dargestellt sind die auf Grundlage der Aminosäuresequenz über dem PHYRE2-Server vorhergesagten Sekundärstrukturelemente. Die Farbgebung stellt die Verlässlichkeit der Vorhersage dar (siehe Legende) (Kelley und Sternberg, 2009). B: Dargestellt ist die Vorhersage der Tertiärstruktur (blau = N-Terminus, rot = C-Terminus). Das Modell wurde auf Grundlage der mittels PHYRE2 vorhergesagten Sekundärstrukturen und Abgleich mit Kristallstrukturen aus der *Protein Data Base* (PDB; www.pdb.org, Stand: Januar 2013) erstellt und anschließend mit der Software Chimera 1.4.1 visualisiert. In hellblau eingezeichnet sind die putativen H-Brücken. Außerdem eingezeichnet ist die Lage der Lysin- und Glutaminreste im Protein. Auf eine Einbeziehung möglicher Cystinbrücken wurde verzichtet.

Das hier simulierte Modell legt nahe, dass Lys7 und Lys107 durch Exposition der geladenen Seitenkette frei zugänglich sind. In der Annahme, dass Lysinreste über Salzbrücken an Aspartyl- oder Glutamyreste gebunden und damit verborgen sein könnten, wurde die Struktur auf solche sauren Aminosäureseitenketten untersucht, die räumlich die Ausbildung von Salzbrücken zum basischen Lysinrest zulassen. Hierbei könnten die Paare Lys11-Asp79, Lys18-Asp17, Lys74-Asp73 sowie Lys92-Asp33 Salzbrücken ausbilden. Wechselwirkungen mit dem Peptidrückgrat wurden in diese Überlegung nicht mit einbezogen.

Während Lysinseitenketten wegen Salzbrücken für eine Umsetzung mit TGase unzugänglich sein können, erfolgt dies bei Glutaminseitenketten über die Ausbildung verzahnter Carboxamiddimere, die ihre hohe Stabilität über Wasserstoffbrücken erhalten. Auch die Interaktion mit Peptidbindungen ist möglich. Auffallend an der Anordnung der Glutaminreste im SPI-Modell war, dass die Seitenketten von Gln32 und Gln87 räumlich sehr nahe beieinander waren. Somit könnten diese beiden Seitenketten sich gegenseitig über H-Brücken fixieren und die Ausbildung des Acylenzymkomplexes mit TGase an diesen Stellen verhindern. Im Modell verbleibt entsprechend nur Gln6 als einzig zugänglicher Rest. Ob diese Voraussagen der natürlichen Orientierung der einzelnen Aminosäurereste entsprach, konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr experimentell bestätigt werden.

Anhand der postulierten Sekundär- und Tertiärstruktur lassen sich Hinweise auf eine funktionelle Verwandtschaft des gesuchten Proteins mit denen finden, deren Sekundärstruktur-Abfolge dem gesuchten am ähnlichsten sind. Deren Architektur wurden daher für das Modell herangezogen. Das Protein, das sowohl bezüglich der Identität zu SPI (26%) als auch hinsichtlich der Verlässlichkeit der Vorhersage (100%) das beste Ergebnis lieferte, war EXLX1, ein expansinähnliches Protein von *B. subtilis* (O34918; PDB: 3D30). Expansine binden verschiedene Polysaccharide außerhalb der Peptidoglycanwände und sorgen damit für Zellwandmodifikationen sowohl bei Bakterien als auch bei Pflanzen, ohne eine enzymatische Aktivität zu besitzen. Es scheint so, als würden sie durch Zugkräfte das Gefüge dehnen und dadurch Platz für die Ausbildung neuer Phasern schaffen. Der exakte Mechanismus ist nicht verstanden (Sampedro und Cosgrove, 2005). Kerff *et al.* charakterisierten EXLX1 hinsichtlich seiner Kristallstruktur und Aktivität und nutzten dafür u.A. die große Strukturhomologie zu Enzymen der Familie 45 Glycosylhydrolasen (45GH) (Kerff *et al.*, 2008). Aus diesem Grund wurden für die folgende Betrachtung neben EXLX1 noch die drei 45GH MeCel45A von *Mytilus edulis* (P82186, PDB: 1WC2), HiCel45 von *Humicola insolens* (P43316, PDB: 2ENG) und MaCel45 von *Melanocarpus albomyces* (Q8J0K8, PDB: 1OA9) strukturell mit SPI verglichen (Abb. 44).



Abb. 44: Strukturalignment von SPI mit EXLX1 und drei Familie 45 Glycosylhydrolasen: Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen im Einbuchstabencode basierend auf vorhergesagten Sekundärstrukturen. Alle Proteine beginnen mit ihrem natürlichen N-Terminus, von EXLX1 (O34918) sind die ersten 130 aa von 207 aa (Domäne 1), von HiCel45 (P43316) 210 aa von 213 aa und von MaCel45 (Q8J0K8) 213 von 214 aa angegeben. Die Sequenzen von SPI und MeCel45A (P82186) sind vollständig dargestellt. Grün unterlegt = α -Helix, rot unterlegt = β -Faltblatt, gelb = identische Aminosäuren, blau = Aspartylrest des Aktivzentrums der Glycosylhydrolasen. Die Zahlen stehen für Aminosäuren, die Kerff *et al.* als strukturhomolog zu EXLX1 bezeichneten (Xu *et al.*, 2000; Kerff *et al.*, 2008; Georgelis *et al.*, 2011).

Alle Proteine weisen wie SPI eine DPBB-Struktur bestehend aus sechs β -Faltblättern auf, welche sich über das gesamte Protein erstreckt (nicht gezeigt). Außer bei EXLX1 ist dies die einzige nachweisbare Domäne. EXLX1 hingegen ist aus zwei Domänen aufgebaut. D1 ist die genannte DPBB-Domäne, während D2 aus vier antiparallelen β -Faltblättern aufgebaut ist, die eine Immunoglobulin-ähnliche β -Sandwichstruktur bilden (Kerff *et al.*, 2008). Eine strukturelle Homologie von SPI besteht nur zu D1, weswegen in Abb. 44 zur Veranschaulichung auf die Angabe von D2 verzichtet wurde. Georgelis *et al.* wiesen aber nach, dass für die Bindung der Polysaccharide das vollständige Protein mit beiden Domänen benötigt. Weder für isoliert produzierte D1 oder D2 noch eine Mischung aus beiden getrennen Domänen konnte eine Aktivität nachgewiesen werden (Georgelis *et al.*, 2011). Trotz dieses Befunds soll an dieser Stelle aufgrund der Homologie zu SPI und den 45GH einzig der Aufbau und die Funktion von D1 betrachtet werden.

Kerff *et al.* entdeckten bei EXLX1 zwei absolut konservierte Aminosäurereste, einen Threoninrest und einen Aspartylrest (Abb. 44, 1 und 7). Diese waren auch in zwei weiteren Expansinen vorhanden (Kerff *et al.*, 2008).

Lässt man diese beiden Proteine außer Acht, so ist zusätzlich ein Alaninrest in allen Proteinen absolut konserviert (Abb. 44, „*-Markierung). Mutationen der beiden erstgenannten Aminosäuren zeigten, dass der Threoninrest zwar an der Aktivität des Proteins hinsichtlich der Zellwandverlängerung beteiligt ist, jedoch nicht entscheidend, wohingegen der Austausch des Aspartylrests das Expansin vollständig inaktivierte. Allen anderen in Abb. 44 markierten Aminosäuren hatten mehr oder weniger Einfluss auf die Expansinaktivität (Georgelis *et al.*, 2011).

Bemerkenswert an dem hier durchgeführten Strukturvergleich ist, dass SPI neben dem für die Expansinaktivität wichtigen Aspartylrest noch einen weiteren Aspartylrest aufweist (3). Dieser ist bei EXLX1 nicht zu finden, stellt jedoch in der 45GH-Familie die zweite Aminosäure des Aktivzentrums dar (Xu *et al.*, 2000). Neben diesem Befund sprechen die vergleichbare Größe von SPI, potentielle Cystinbrücken, die Thermostabilität und die analoge DPBB-Architektur dafür, dass es sich bei SPI eher um ein Protein aus der 45GH-Familie handelt. Allerdings sind die meisten anderen Mitglieder der Familie (InterPro-ID: IPR000334, Stand Januar 2013), die aus nur einer Domäne aufgebaut sind, bedeutend größer.

Experimentell konnte in dieser Arbeit keine hydrolytische Aktivität gegen Dextran, Saccharose, Agarose, Stärke, Cellulose, Carboxymethylcellulose oder Chitin nachgewiesen werden, wobei nach der Methode von Bernfeld (1955) das höhere Reduktionspotential von Hydrolysaten gegenüber Dinitrosalicylsäure bestimmt wurde (Daten nicht gezeigt). Wegen der großen Substratspezifität der Glycosylhydrolasen und der hohen Zuckervielfalt in der Natur können diese Versuche nur ein erster Anhaltspunkt sein und schließen grundsätzlich eine Expansin-ähnliche Funktionalität von SPI nicht aus.

3.5. Antibakterielle Eigenschaften des Holo-SPI

Die in der AG Fuchsbauer entwickelte Hypothese über die Wirkungsweise der drei bekannten proteinösen Proteaseinhibitoren als Schutzschilde gegen sekretierte Proteasen koexistierender Organismen setzt eine antibiotische

Wirkung der Proteine voraus. Diese wurde für DAIP auch schon teilweise nachgewiesen (Sarafeddinov *et al.*, 2009). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sich beim *Streptomyces*-Papaininhibitor um ein Apoprotein-Kofaktor-System handeln muss. Beide Komponenten besitzen offensichtlich eine hohe Affinität zueinander. Auch wenn die eigentliche Funktion des proteinösen Faktors nicht geklärt werden konnte, wurde wegen dieser hohen Affinität für die folgenden Untersuchungen das Holoprotein verwendet, welches direkt aus der Kulturbrühe von *S. mobaraensis* gewonnen und anschließend über die beschriebenen Verfahren gereinigt wurde. Anschließend wurden die nachfolgenden Untersuchungen zur Bestimmung der antibakteriellen Wirkung von Holo-SPI durchgeführt.

Cysteinproteasen sind bei Pflanzen und Bakterien weit verbreitet und dienen dabei häufig als molekulare Waffen (Shindo und Van der Hoorn, 2008; Bleischwitz *et al.*, 2010). Bei Prokaryonten sind sie zwar unterrepräsentiert, wegen der aufkommenden Resistenz gegen konventionelle Antibiotika sind diese Proteasen jedoch als neue Angriffspunkte gegen pathogene Bakterien interessant geworden (Potempa und Pike, 2005; Rudenskaya und Pupov, 2008; Robinson und Dalton, 2011). Aus diesem Grund sollte Holo-SPI auf seine inhibierende Wirkung gegen papainähnliche Enzyme getestet werden, die von verschiedenen pathogenen Bakterien auf unterschiedlichste Weise genutzt werden. Die nachfolgenden Untersuchungen wurden bis auf die Wachstumsinhibition von *E. coli* wegen der Pathogenität der Bakterien in Zusammenarbeit mit Kaman am Erasmus Medical Centre Rotterdam in der Abteilung für Medizinische Mikrobiologie und Infektionen durchgeführt.

3.5.1. Holo-SPI als Inhibitor gegen sekretierte Cysteinproteasen

Um die inhibitorische Aktivität des nach Sarafeddinov *et al.* aus der Kulturbrühe von *S. mobaraensis* isoliertem Holo-SPI auf sekretierte Cysteinproteasen zu testen, wurde deren verbleibende Aktivität durch Hydrolyse der Peptide *FITC*-L_(D)LK- ϵ Dbc (BikKam1), *FITC*-R_(D)RK- ϵ Dbc

(BikKam13), *FITC-RRK-εDbc* (BikKam16), *FITC-FRK-εDbc* (BikKam17) und *FITC-AAGPAAK-εDbc* (BikKam18) mit gelöschter Fluoreszenz und Bestimmung der ansteigenden Emissionsintensität bei konstanter Substrat- und Inhibitorkonzentration bestimmt (Sarafeddinov *et al.*, 2011; Kaman *et al.*, 2011, 2012). Dabei wurde einerseits der zellfreie Kulturüberstand mit Gingipain K und R1 von *Porphyromonas gingivalis*, im Folgenden als KPG bzw. RPG bezeichnet, sowie eine unbekannte Protease von *Bacillus anthracis*, und andererseits die Sigma-Protease Staphopain B von *Staphylococcus aureus* eingesetzt (im Folgenden als SspB bezeichnet). Als Kontrolle wurde die Inhibitoraktivität der sekretierten Metalloprotease Collagenase von *Clostridium histolyticum* getestet. Die verbleibende Aktivität wurde aus einer Endzeitmessung nach 60 min ermittelt (Tab. 46).

Tab. 46: Restaktivität sekretierter Cysteinproteasen pathogener Bakterien im zellfreien Kulturüberstand bzw. der gereinigten Proteasen in Gegenwart von Holo-SPI: 1 µM Holo-SPI, 16 µM Substrat und filtrierter Kulturbrüheüberstand (0.22 µm) bzw. in PBS gelöstes Enzym (60 µg ml⁻¹ Staphopain B, 80 µg ml⁻¹ Collagenase) wurden im Gesamtvolumen von 50 µl für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die proteolytische Aktivität wurde in 2 min-Intervallen durch Bestimmung der A₅₃₀ verfolgt und auf das ungehemmte Enzym normiert.

Organismus	Cysteinprotease	Substrat	Sequenz	Aktivität / %
<i>P. gingivalis</i>	Gingipain K	BikKam13	<i>FITC-R_(D)RK-εDbc</i>	3
	Gingipain R1	BikKam16	<i>FITC-RRK-εDbc</i>	17
<i>B. anthracis</i>	Unbekannt	BikKam1	<i>FITC-L_(D)LK-εDbc</i>	38
<i>St. aureus</i>	Staphopain B	BikKam17	<i>FITC-FRK-εDbc</i>	50
<i>C. histolyticum</i>	Collagenase	BikKam18	<i>FITC-AAGPAAK-εDbc</i>	89

Dabei zeigte sich, dass die Aktivität von KPG annähernd vollständig von 1 µM Papaininhibitor gehemmt wird. Bei RPG war die Wirkung von 1 µM Holo-SPI um eine Größenordnung niedriger, während SspB um die Hälfte inaktiviert wurde. Interessanterweise war ein Verlust an proteolytischer Aktivität des Kulturüberstands von *B. anthracis* ebenfalls festzustellen. Dies war so nicht zu erwarten, da im Genom von *B. anthracis* keine Gene für sekretorische,

papainähnliche Proteasen vorhanden sind (Read *et al.*, 2003). Da Holo-SPI jedoch neben Cysteinproteasen auch Trypsin hemmt, dieses jedoch in einem geringeren Maße (Sarafeddinov *et al.*, 2011), lag die Vermutung nahe, dass eine nicht näher definierte Serinprotease gehemmt wurde. Die als Kontrolle eingesetzte Collagenase blieb wie erwartet annähernd unberührt und zeigte weiterhin hohe Hydrolyseaktivität.

Um die Wirkung von Holo-SPI auf KPG und RPG genauer zu untersuchen, wurden mit dem zellfreien Kulturüberstand von *P. gingivalis* die Messungen der Proteaseaktivität in Gegenwart von 10 nM bis 1 000 nM Holo-SPI bei konstanter Enzym- und Substratkonzentration und pH 7.4 durchgeführt. Um kompetitive Bedingungen während der Inkubation zu gewährleisten, wurden sowohl Inhibitor als auch Substrat zeitgleich zum Kulturüberstand zugegeben. Die Restaktivität wurde wie zuvor bestimmt (Abb. 45).

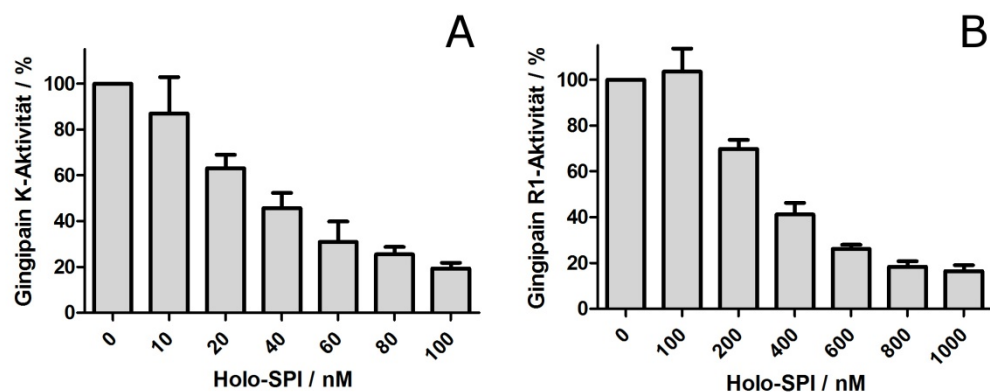


Abb. 45: Restaktivität von Gingipain K (A) und Gingipain R1 (B) im Kulturüberstand von *P. gingivalis* in Gegenwart variabler Mengen Holo-SPI (Endpunkt): Der Proteaseaktivitätstest wurde wie über Tab. 46 beschrieben durchgeführt, jedoch mit variablen Mengen Holo-SPI. Die proteolytische Aktivität wurde nach 60 min durch Bestimmung der A_{530} bestimmt und auf das ungehemmte Enzym normiert. N = 3

Dabei zeigte sich eine Hemmung der jeweiligen Protease bereits im nanomolaren Bereich, wobei sich die effektiven Konzentrationen für KPG und RPG wieder um eine Größenordnung unterschieden. Der IC_{50} von Holo-SPI gegenüber KPG lag bei etwa 40 nM und gegenüber RPG bei etwa 300 nM. Ob die Affinität von Holo-SPI gegenüber beiden Proteasen unterschiedlich war oder ob das eine der beiden Substrate besser mit Holo-SPI um das Aktivzentrum konkurrierte, ließ sich aus den Ergebnissen nicht ableiten. Um weitergehende

Informationen über den Verlauf der *FITC-R_(D)RK-εDbc*-Hydrolyse durch KPG in Gegenwart von 0-100 nM Holo-SPI zu erhalten, wurde die Restaktivität nach regelmäßigen Abständen über 60 min mit konstanter Enzym- und Substratkonzentration bestimmt (Abb. 46).

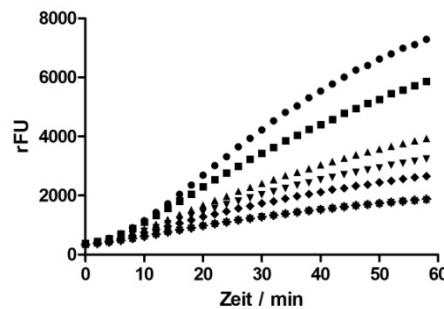


Abb. 46: **Restaktivität von Gingipain K im Kulturüberstand von *P. gingivalis* in Gegenwart verschiedener Mengen Holo-SPI (zeitlicher Verlauf):** Der Proteaseaktivitätstest wurde wie über Tab. 46 beschrieben durchgeführt, jedoch mit variablen Mengen Holo-SPI. Die proteolytische Aktivität wurde in 2 min-Intervallen durch Bestimmung der A_{530} verfolgt. (●) = 0 nM, (■) = 10 nM, (▲) = 20 nM, (▼) = 40 nM, (◆) = 60 nM, (⬤) = 80/100 nM Holo-SPI; N = 3

Alle Geschwindigkeitsprofile zeigten einen ähnlichen sigmoidalen Verlauf. Auch wenn Holo-SPI im Ansatz nicht vorhanden war, wurde jedoch entweder eine vollständige Hydrolyse des Substratproteins nach 60 min nicht erreicht oder aber es kam über Interaktion benachbarter Peptide zu einem erneuten Quenchingeffekt. Der stärkste Inhibierungseffekt war bereits bei den niedrigsten Konzentrationen zu beobachten. Zwischen 20 nM und 80 nM Holo-SPI zeigten sich nur noch geringe Aktivitätsdifferenzen. Oberhalb von 80 nM Holo-SPI fand keine weitere Inhibierung statt, obwohl *FITC-R_(D)RK-εDbc* weiterhin langsam fragmentierte. Da jedoch Kulturbrühenüberstand zum Einsatz kam ist nicht auszuschließen, dass diese Beobachtung durch andere vorhandene Proteasen verursacht wurde.

3.5.2. Holo-SPI als wachstumsinhibierender Faktor gegen Mikroorganismen

Die inhibierende Wirkung von Holo-SPI auf die proteolytische Aktivität im zellfreien Kulturüberstand von *B. anthracis* gab auch Anlass zu der Vermutung,

dass papainähnliche Zellwandhydrolasen betroffen sein könnten. Diese spielen bei der Zellteilung durch ihre Beteiligung am Abbau des Peptidoglycans von Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien eine entscheidende Rolle (Park und Uehara, 2008; Reith und Mayer, 2011). Ein Beispiel hierfür sind Mitglieder der NlpC/P60-Superfamilie wie die Autolysine LytE und LytF von *B. subtilis*, die Amidbindungen von D- γ -Glutamyl-meso-diaminopimelinsäure des Mureinsacculus hydrolysieren und deren Bedeutung für das Überleben des Organismus bereits durch Deletion der entsprechenden codierenden Gene gezeigt werden konnte (Anantharaman und Aravind, 2003; Xu *et al.*, 2011).

Um den antibiotischen Einfluss von Holo-SPI zu untersuchen, wurden Wachstumskurven von *B. anthracis* (Abb. 47A), *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (B), *Pseudomonas aeruginosa* (C), *Staphylococcus aureus* (D), *Vibrio cholerae* (E) und *Yersinia pestis* (F) über einen Zeitraum von 12 h unter Einfluss von 0, 2.5, 5 und 10 μ M Holo-SPI aufgenommen. Dabei wurde kontinuierlich jede Stunde die Zelldichte durch Aufnahme der OD₆₀₀ bestimmt. Als Kontrolle wurde jeweils die OD₆₀₀ für unbeimpftes Medium sowie für *E. coli* das Wachstum unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen an DAIP bestimmt (G).

Die Untersuchung ergab, dass Holo-SPI das Wachstum aller verwendeten Bakterien inhibierte. Bereits eine Konzentration von 10 μ M im Ansatz reichte aus, um das Wachstum vollständig zu hemmen, und selbst eine Konzentration von 5 μ M verzögerte das Wachstum meist um mehrere Stunden. DAIP hingegen zeigte zumindest bei *E. coli* bei keiner der getesteten Konzentrationen einen Einfluss auf das Wachstum.

Um abschließend Holo-SPI als Bakteriostatikum oder Bakterizid einordnen zu können, wurden Flüssigkulturen von *Y. pestis*, *P. aeruginosa*, *B. anthracis* und *V. cholerae*, deren Wachstum durch Inkubation mit 10 μ M Holo-SPI vollständig gehemmt war, auf frisches Nähragarmedium überimpft und 72 h inkubiert (Abb. 48).

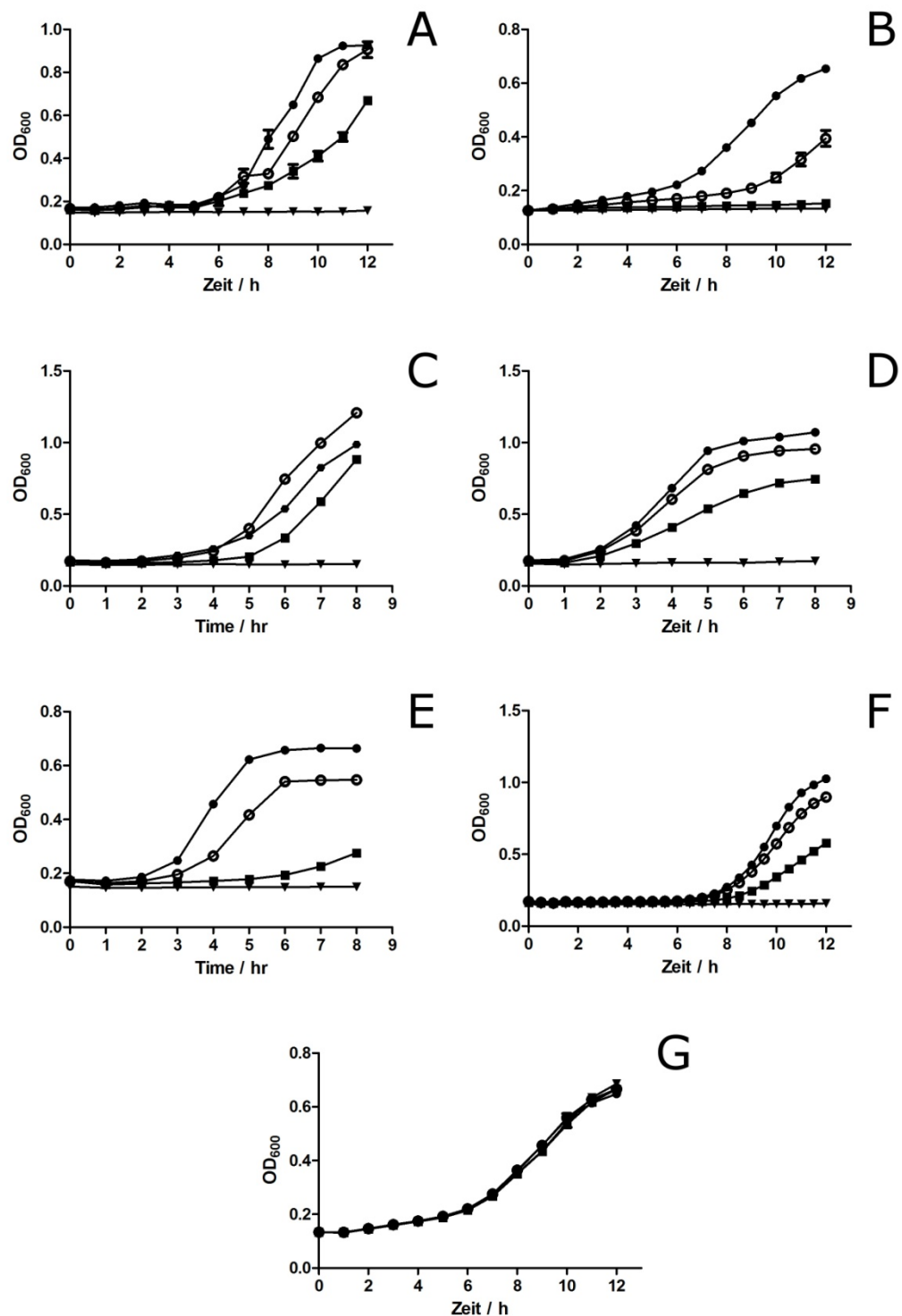


Abb. 47: Einfluss von Holo-SPI (A - F) und DAIP (G) auf das bakterielle Wachstum:
 Dargestellt ist die Zunahme der Zelldichte einer Submerskultur über kontinuierliche Aufnahme der OD₆₀₀ jede 1 h für 12 h unter Einfluss von 0 μM (●), 2.5 μM (○), 5 μM (■) und 10 μM (▼) Holo-SPI (A - F) bzw. denselben Konzentrationen DAIP (G) auf *B. anthracis* (A), *E. coli*, (B, G), *P. aeruginosa* (C), *St. aureus* (D) *V. cholerae* (E) und *Y. pestis* (F); N = 3

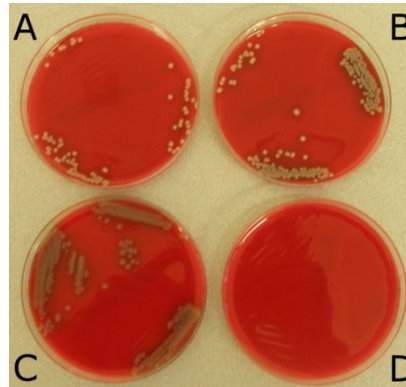


Abb. 48: Erneute Anzucht von durch SPI wachstumsinhibierten pathogenen Bakterien auf inhibitorfreiem Columbia Blutagar: Das bakterielle Wachstum wurde wie unter Abb. 47 beschrieben mit 10 μ M Holo-SPI gehemmt. Am Folgetag wurde die so erzeugte Submerskultur auf inhibitorfreiem Columbia Blutagar ausgestrichen und für 72 h bei 35 °C inkubiert. *Y. pestis* (A), *P. aeruginosa* (B), *B. anthracis* (C), *V. cholerae* (D)

Nach den Ergebnissen ist SPI in Abhängigkeit vom Bakterienstamm entweder ein Bakteriostatikum oder Bakterizidikum. So zeigte *V. cholerae* (Abb. 48D) kein Wachstum, während *Y. pestis* (A), *P. aeruginosa* (B) und *B. anthracis* (C) auf frischem Nährmedium ohne Inhibitor Kolonien ausbilden konnten. Es scheint, als würden *Y. pestis*, *P. aeruginosa* und *B. anthracis* Resistenzmechanismen besitzen, um SPI zu inaktivieren.

3.5.3. Zytotoxizität des *Streptomyces*-Papaininhibitors gegenüber Säugerzellen

Die vorhergehenden Untersuchungen zeigten eine inhibierende Wirkung von SPI auf das Wachstum von Bakterienzellen. Um die zytotoxischen Eigenschaften des Proteins gegenüber Säugerzellen zu bestimmen, wurde die Viabilität von RAW264.7-Zellen mittels Lactatdehydrogenase-Assay bestimmt. Hierzu wurden dieselben SPI-Konzentrationen eingesetzt, die bereits zur Bestimmung der inhibierenden Konzentration für bakterielle Zellen verwendet wurden. Hierbei ließ sich keine Zytotoxizität des Proteins auf Säugerzellen nachweisen (Abb. 49).

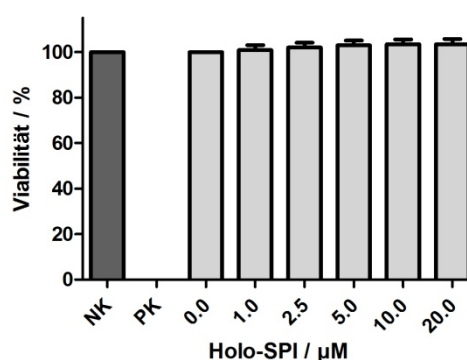


Abb. 49: Zytotoxische Wirkung von Holo-SPI auf RAW264.7-Zellen: Die Zellen wurden für 2 h mit 0-10 μM SPI bzw. Kulturmedium (Negativkontrolle, NK) oder 1% Triton-X100 (Positivkontrolle, PK) bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert. Die Bestimmung der Viabilität erfolgte mittels Lactatdehydrogenase-Assay durch Inkubation von 100 μl zellfreiem Kulturüberstand und 100 μl LDH-Reaktionslösung für 30 min bei RT und anschließender Bestimmung der A490. Dargestellt ist die relative Viabilität normiert auf die Negativkontrolle. N = 3

3.6. Charakterisierung des Dispaseautolyse-induzierenden Proteins DAIP

Neben den Untersuchungen am *Streptomyces*-Papaininhibitor war die Charakterisierung des Dispaseautolyse-induzierende Proteins DAIP ein zweites Thema dieser Arbeit. DAIP wirkt als Antagonist gegen neutrale Metalloproteasen wie Dispase von *Paenibacillus polymyxa* und Thermolysin von *B. thermoproteolyticus rokko*, jedoch nicht in Form eines klassischen Inhibitors wie z.B. SSTI, sondern indem es die Autolyse der Zielproteasen einleitet. Der zugrundeliegende Mechanismus ist bisher nicht geklärt. Untersuchungen zeigten, dass es sich bei dem Protein nicht um einen Chelatbildner handelt, der durch Entzug des Metallions eine Konformationsänderung der Metalloprotease hervorruft, wodurch deren Autolyse induziert werden könnte. Vergleichsuntersuchungen mit EDTA zeigten, dass hier eine zehntausendfach höhere Konzentration notwendig ist, um einen DAIP-vergleichbaren Effekt zu erzielen. Ebenso ist z.B. die Thermolysin-ähnliche Metalloprotease TAMEP von *S. mobaraensis* kein Substrat von DAIP. DAIP inaktiviert Dispase bei einem Inhibitor:Enzym-Verhältnis von 1:10 innerhalb 30 min vollständig (nachfolgend als I:E-Verhältnis

bezeichnet). Da aus stöchiometrischen Gründen die Ausbildung eines stabilen Komplexes nicht vorstellbar ist, wurde DAIP eine enzymatische Aktivität unterstellt. Eine Endoproteaseaktivität konnte ausgeschlossen werden, da das Protein nicht in der Lage ist, Standardsubstrate wie Casein, Myoglobin, Hämoglobin und Myosin oder verschiedene Proteasen wie Papain, Trypsin, TAMEP etc. zu hydrolysieren. Auch eine Aminopeptidaseaktivität konnte nicht nachgewiesen werden (Zotzel, 2002; Sarafeddinov *et al.*, 2009). Somit scheint es sich bei DAIP um einen vollkommen neuen Proteintyp zu handeln.

Wie schon beim *Streptomyces*-Papaininhibitor war auch von DAIP zu Beginn dieser Arbeit nur ein N-terminales Peptid von 23 aa bekannt (Abb. 50). Die Sequenz zeigte keine Homologie mit anderen Proteinen, die in den Datenbanken gelistet sind (Sarafeddinov *et al.*, 2009).



Abb. 50: Durch Edman-Abbau sequenziertes N-terminales Peptid des Dispaseautolyse-induzierenden Proteins von *S. mobaraensis* (Sarafeddinov *et al.*, 2009): Angegeben sind die Aminosäuren im Einbuchstabencode. Nicht analysierbare Aminosäuren sind mit X gekennzeichnet.

Versuche, das DAIP-codierende Gen mittels PCR aus der genomischen DNA von *S. mobaraensis* zu amplifizieren, scheiterten daran, dass keine Vergleichs-peptidsequenzen für die Erstellung eines Rückwärtsprimers zur Verfügung standen. In vorangegangenen Arbeiten sequenzierte innere Peptide, deren Sequenzen zur Primererstellung herangezogen wurden, erwiesen sich nachträglich als Fehlanalysen. Da DNA-Sonden, die auf Grundlage des beschriebenen N-Terminus nach der Nutzungshäufigkeitstabelle von *S. mobaraensis* (Tab. 57) erstellt wurden, unselektiv an das hydrolysierte Genom banden, war eine Isolierung entsprechender Genomabschnitte mit anschließender Sequenzierung nicht möglich. Somit war eine Aufklärung des codierenden Gens nach den für SPI beschriebenen Methoden nicht möglich. Dies sowie daraus abgeleitet die Aufklärung der Primärstruktur des Proteins erfolgten zu einem späteren Zeitpunkt durch Sequenzierung des Genoms von *S. mobaraensis* und anschließender tBLASTn-Analyse (siehe unten).

Die Produktion und Aufreinigung von DAIP aus der Kulturbrühe von *S. mobaraensis* erfolgte nach dem von Sarafeddinov *et al.* beschriebenen Verfahren. Nach der Kultivierung in einer Submerskultur bei 28 °C über 48 h erfolgte die Abtrennung unerwünschter Proteine durch fraktionierende Ethanolfällung. Hierbei präzipitierte das Zielprotein bei einer Ethanolkonzentration von 50-80%. Das Präzipitat wurde in 50 mM Acetat, pH 4.0, resuspendiert und über eine KIC mit linearem NaCl-Gradienten von 0-1 M isoliert (Sarafeddinov *et al.*, 2009). Die so erhaltenen Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE, Western Blot-Analyse und Enzymaktivitätstests hinsichtlich ihrer Reinheit und Inhibitoraktivität charakterisiert und anschließend entsprechend vereinigt (Daten nicht gezeigt).

3.6.1. Fragmentierungsuntersuchungen von DAIP während der Denaturierung

Frühere elektrophoretische Untersuchungen zeigten eine schwache Fragmentierung von DAIP während der Denaturierung mit SDS. Üblicherweise wird die Denaturierung für 15 min bei 90 °C durchgeführt. Um die „artifizielle“ Fragmentierung zu vermeiden, wurde DAIP nur eine halbe Minute in vorgeheiztem Denaturierungspuffer erhitzt.

Um zu überprüfen, ob die Fragmentierung einem geordneten Mechanismus unterliegt, wurde DAIP über 0.5, 5 und 15 min bei 90 °C mit SDS und verschiedenen Additiven denaturiert und elektrophoretisch analysiert (Abb. 51). Wegen der größeren Sensitivität wurde eine Silberfärbung gewählt.

Die Untersuchungen zeigten ein geordnetes Fragmentierungsmuster, was dafür spricht, dass eine enzymatische Hydrolyse distinkter Peptidbindungen abläuft und eine thermische Zersetzung unwahrscheinlich ist. Allerdings zeigte der Versuch eine vergleichsweise langsame Autolyse von DAIP. Nur in Gegenwart von β -Mercaptoethanol wurden die Fragmentbanden mit der Inkubationszeit verstärkt.

Alle Spuren zeigten neben der DAIP-Bande bei ca. 37 kDa Verunreinigungen von mutmaßlich SPI bei ca. 12 kDa. Zusätzlich waren nach

einer Inkubation über 0.5 min in allen Denaturierungspuffern bei ca. 20, 27 und 33 kDa distinkte Banden zu erkennen. Die 33 kDa-Bande war jedoch bei den Untersuchungen ohne β -Mercaptoethanol im Denaturierungspuffer bereits nach 5 min Inkubation nicht mehr nachweisbar (Abb. 51, Spur 2 und 8). Zeitgleich war bei der Denaturierung ohne β -Mercaptoethanol das Auftreten einer Bande bei ca. 14 kDa sowie im weiteren Verlauf das Auftreten einer Bande bei ca. 22 kDa zu erkennen. Dies spricht ebenfalls für einen enzymatischen Abbau.

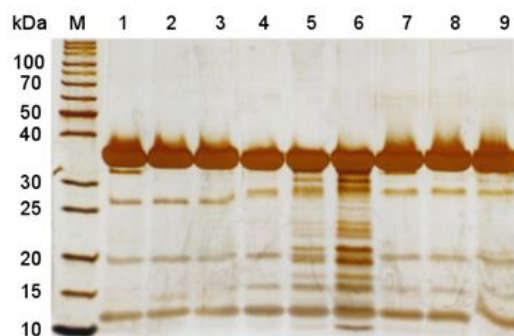


Abb. 51: Fragmentierungsmuster von gereinigtem DAIP nach Denaturierung mit SDS und unterschiedlichen Additiven: *S. mobaraensis* wurde für 48 h bei 28 °C und 110 rpm submers kultiviert. Die Isolation und Reinigung von DAIP aus der Kulturbrühe erfolgte durch fraktionierende Ethanol-fällung (50-80%) gefolgt von einer KIC des in 50 mM Acetat, pH 4.0 resuspendierten Proteinpellets mit linearem NaCl-Gradient von 0-1 M. 25 μ g DAIP wurden für 0.5 min (Spuren 1, 4, 7), 5 min (2, 5, 8) bzw. 15 min (3, 6, 9) in Denaturierungspuffer ohne Additive (Spuren 1 - 3), mit β -Mercaptoethanol (4 - 6) bzw. mit 2 mM 1,10-Phenathrolin und 10 mM EDTA (7 - 9) bei 90 °C denaturiert. Die Elektrophorese mit einem 12.5% Polyacrylamidgel und Silberfärbung erfolgten wie im Methodenteil beschrieben. Auftragungsvolumen: 20 μ l. M = Proteinstandard, Auftragungsvolumen 15 μ l 1:5 verdünnt.

Besonders auffällig war jedoch das Fragmentierungsverhalten von DAIP in Gegenwart von β -Mercaptoethanol (Abb. 51, Spur 4 - 6), welches zur Reduktion potentiell vorhandener Cystinbrücken eingesetzt wird. Bei dieser Untersuchung zeigte sich, dass bereits nach 5 min ein Leitemuster zu erkennen war, dessen Bandenanzahl die Mischungen ohne Thiolreagenz übertraf. Nach einer Inkubation über 15 min nahm die Intensität der Banden, die bereits nach 5 min zu erkennen waren, weiter zu. Die später erhaltene Aminosäuresequenz zeigt, dass DAIP zwei Cysteinreste besitzt. Die putative Sekundär- und Tertiärstruktur legt die Bildung vermutlich einer Cystinbrücke nahe (siehe unten). Das hier durchgeführte Experiment spricht für eine stabilisierende Cystinbrücke. Wird diese geöffnet, kommt es zu einer verstärkten Fragmentierung. Offensichtlich

besitzt DAIP unter den gewählten Bedingungen eine proteolytische bzw. Autolyseaktivität.

3.6.2. Weitere Untersuchungen für den Nachweis einer enzymatischen Aktivität von DAIP

Vorhergehende Untersuchungen wiesen auf eine proteolytische Aktivität von DAIP hin. Eine DAIP-induzierte Dispaseautolyse sollte entsprechend zeit- und konzentrationsabhängig sein. Diese Versuche wurden wieder durch SDS-PAGE analysiert (Abb. 52).

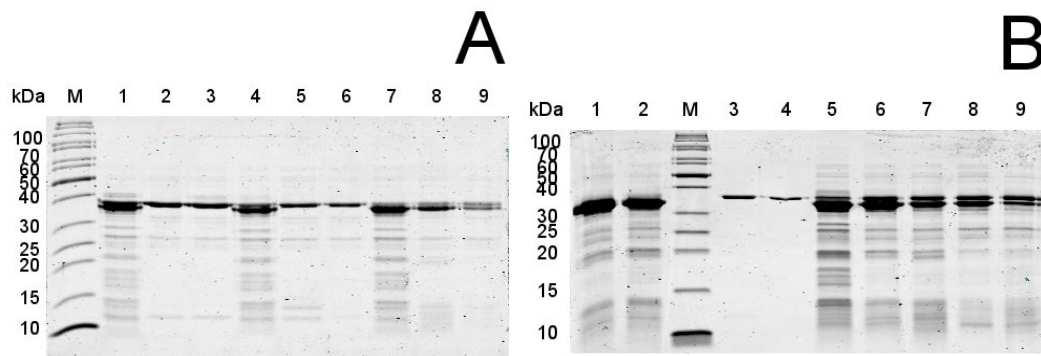


Abb. 52: Konzentrations- (A) und zeitabhängige Autolyse (B) von Dispase in Gegenwart von DAIP: Die Produktion von DAIP erfolgte wie unter Abb. 51 beschrieben. Die elektrophoretische Trennung erfolgte wie im Methodenteil beschrieben. A: 4.79 μM Dispase und 2.87 μM (I:E = 6:10; Spuren 1 - 3), 0.96 μM (2:10; 4 - 6) und 0.48 μM DAIP (1:10; 7 - 9) wurden für 0 min (Spur 1, 4, 7), 10 min (2, 5, 8) und 30 min (3, 6, 9) bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Injektion der Proteinmischung in SDS-Auflaufpuffer und Erhitzen für 30 sek auf 90 °C abgebrochen. 12.5% Polyacrylamid-Gel. M = Proteinstandard, Auftragsvolumen: 15 μl 1:5 verdünnt. B: 14.8 μM Dispase und 1.48 μM DAIP in 100 mM Tris-HCl, pH 7.5 wurden über 0-20 min inkubiert. 15% Polyacrylamid-Gel. Auftragsvolumen: 20 μl . Spur 1: Dispase, 0 min; Spur 2: Dispase, 20 min; Spur 3: DAIP, 0 min; Spur 4: DAIP: 20 min; Spur 5: Dispase + DAIP, 0 min; Spur 6: Dispase + DAIP, 5 min; Spur 7: Dispase + DAIP, 10 min; Spur 8: Dispase + DAIP, 15 min; Spur 9: Dispase + DAIP, 20 min.; M = Proteinstandard, Auftragsvolumen: 15 μl 1:5 verdünnt. Alle Konzentrationsangaben beziehen sich auf den Gesamtansatz.

Die Untersuchungen zeigten zweifelsfrei eine Dispaseautolyse, die von der DAIP-Konzentration abhing. Bei I:E-Verhältnissen von 6:10 und 2:10 war bereits nach 10 min keine Dispase mehr nachweisbar (Abb. 52A, Spuren 1 - 3 sowie 4 - 6). Nur bei einem I:E-Verhältnis von 1:10 ließ sich die Abnahme der Dispasebande verfolgen (Spuren 7 - 9). Während sowohl DAIP als auch Dispase alleine über einen Zeitraum von 20 min keine Autolyse erfuhren (Abb.

52B, Spuren 1 - 4), war in der 1:10-Mischung die Bildung distinkter Dispasefragmente beobachtbar. Neben einer Konzentrations- ließ sich daher auch zweifelsfrei eine Zeitabhängigkeit der Dispaseautolyse nachweisen. Unmittelbar nach der Vereinigung beider Proteine war bereits eine Abnahme der Dispasebande erkennbar, deren Intensität bei einer Inkubation über 20 min immer weiter abnahm (Spuren 5 - 9). Nach einer Verlängerung der Inkubation auf 30 min war die Dispasebande nicht mehr nachweisbar (nicht gezeigt). Dieser Versuch bestätigte, dass DAIP mit hoher Wahrscheinlichkeit eine enzymatische Aktivität besitzt. Gleichzeitig konnte anhand dieser Untersuchungen festgestellt werden, dass es allem Anschein nach zu einer geregelten Degradation der Dispase kommt. Das Auftreten von distikten Banden bei ca. 14, 19, 26 und 28 kDa deutete auf Bindestellen für DAIP hin. Dass diese Fragmente jedoch tatsächlich von Dispase stammten, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob bei wiederholter Zugabe von Dispase eine Sättigung von DAIP mit Dispase eintritt. Dies spräche für die Ausbildung eines klassischen Proteinkomplexes und würde eine enzymatische Aktivität von DAIP ausschließen. Zu diesem Zweck wurden DAIP und Dispase über 40 min bei 37 °C in einem I:E-Verhältnis von 1:20 inkubiert. Alle 10 Minuten wurden Aliquots der Reaktionsmischung durch Injektion mit SDS denaturiert. Anschließend wurde für weitere 40 Minuten erneut Dispase zugegeben, so dass wieder das I:E-Verhältnis von 1:20 vorlag. Die Probenahme erfolgte wieder im 10-Minutenabstand (Abb. 53).

Die Untersuchungen zeigten deutlich, dass bereits nach 20 min (Abb. 53, Spur 3) keine Dispasebande mehr vorhanden war. Ebenfalls zu erkennen war jedoch, dass eine erneute Zugabe von Dispase abermals zu ihrer Autolyse führte (Spuren 8 - 12). Mit dem Versuch konnte eine Sättigung von DAIP mit Dispase und damit die Ausbildung eines Proteinkomplexes ausgeschlossen werden. Vielmehr bestätigte sich die enzymatische Aktivität von DAIP. Zwar war die Degradation der zweiten Zugabe langsamer als die der ersten, jedoch ließ sich parallel eine Abnahme der DAIP-Bande feststellen. Dies lässt den Schluss

zu, dass DAIP entweder durch Autolyse oder Dispase über den langen Zeitraum abgebaut wurde.

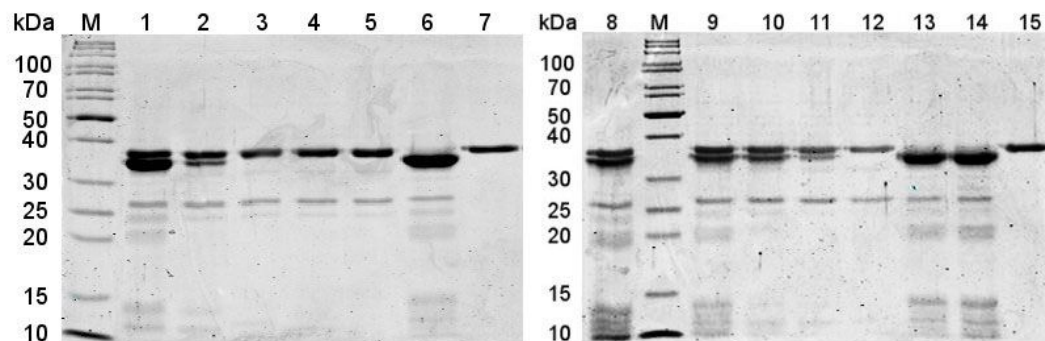


Abb. 53: DAIP-Aktivität nach wiederholter Zugabe von Dispase: Die Produktion erfolgte wie unter Abb. 51 beschrieben. 14.1 μM Dispase und 2.8 μM DAIP in 200 μl 100 mM Tris-HCl, pH 7.5 wurden über 40 min bei 37 °C inkubiert. Nach 0 min (Spur 1), 10 min (Spur 2), 20 min (Spur 3), 30 min (Spur 4) und 40 min (Spur 5) wurden je 20 μl entnommen und die Reaktion durch Injektion in Denaturierungspuffer abgebrochen. Zu der verbleibenden Proteinlösung wurden 50 μl einer 9.38 μM Dispaselösung zugegeben und wiederum nach 0 min (Spur 8), 10 min (Spur 9), 20 min (Spur 10), 30 min (Spur 11) und 40 min (Spur 12) durch Entnahme und Denaturierung die Reaktion eines 20 μl -Aliquots abgebrochen. Die anschließende Analyse erfolgte über SDS-PAGE wie im Methodenteil beschrieben. Spur 6: 14.07 μM Dispase, 0 min; Spur 7: 2.81 μM DAIP, 0 min; Spur 13: 14.07 μM Dispase, 40 min; Spur 14: 14.07 μM Dispase, 80 min; Spur 15: 2.81 μM DAIP, 80 min. Auftragungsvolumen: 20 μl . M = Proteinstandard, Auftragungsvolumen 15 μl 1:5 verdünnt.

3.6.3. Hemmung der autolyseinduzierenden Aktivität von DAIP

Die vorhergehenden Untersuchungen ließen alle auf eine enzymatische Aktivität des DAIP als Ursache für die Autolyseinduktion schließen. Zudem konnte in Vorversuchen gezeigt werden, dass die Autolyse von Dispase in Gegenwart von DAIP durch Vorinkubation des inaktivierenden Proteins mit Serin- oder Cysteinproteaseinhibitoren verzögert wird (Daten nicht gezeigt). Um diesen Befund näher zu charakterisieren, wurden fluorimetrische Messungen mit einem Substrat für neutrale Metalloproteasen durchgeführt. Nachteil dieser Methode war, dass die Aktivität von DAIP auf diese Weise nur indirekt bestimmt werden konnte. Der von Weimer *et al.* entwickelte Aktivitätstest für P1'-Endoproteaseaktivität von Metalloproteasen wurde für Messungen in Mikrotiterplatten adaptiert. Durch Hydrolyse des Dipeptids Dabcyl-Ser-Phe-EDANS mit gelöschter Fluoreszenz kommt es zu einem Anstieg der

Emissionsintensität (Weimer *et al.*, 2006). Die Fluoreszenz korreliert somit direkt mit Protease- und indirekt DAIP-Aktivität. Zunächst wurden mögliche DAIP-Inhibitoren mit dem Casein-Anson-Test vorsortiert. Von den verwendeten Serin- Cystein- und Aspartylproteaseinhibitoren Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid (AEBSF), N^α-Tosyl-L-lysinchloromethylketon (TLCK), Leupeptin, N-Ethylmaleinimid (NEM) und Pepstatin A hatten nur AEBSF und TLCK einen Effekt auf DAIP. Weitere Untersuchungen mit Dabcyl-Ser-Phe-EDANS, bestätigt durch SDS-PAGE, zeigten, dass DAIP von 1-2 mM AEBSF und 1-2 mM TLCK gehemmt wird. Eine Korrelation mit der Inhibitorkonzentration bestand jedoch nicht. Demgegenüber hatte DMSO, das als Lösungsmittel für PMSF verwendet wurde, eine konzentrationsabhängige Wirkung auf DAIP. Daraus wurde geschlossen, dass das Lösungsmittel direkten Einfluss auf das Protein nimmt (alle Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse legen nahe, dass DAIP weder eine Serin- noch eine Cysteinprotease ist. Da DMSO Pepsin vollständig inhibiert (Kesavulu *et al.*, 2005), ist möglicherweise eine Aspartylproteaseaktivität vorhanden, auch wenn Pepstatin A keinen Effekt zeigte.

3.6.4. Untersuchungen auf eine Aminopeptidaseaktivität von DAIP

Frühere Arbeiten schlossen bereits eine Aminopeptidaseaktivität des DAIP aus (Zotzel, 2002). Die Ergebnisse sollten mit zusätzlichen Substraten verifiziert und ergänzt werden (Tab. 47). Hierzu wurden 0.4 µM DAIP mit 400 µM Dipeptid inkubiert, die C-seitig mit einer *para*-Nitroanilidgruppe (pNA) derivatisiert waren. Durch Hydrolyse der Amidbindung färbt freigesetztes p-Nitroanilin die Reaktionsmischung gelb.

Die Versuche zeigten, dass DAIP keines der Substrate hydrolysieren konnte, und bestätigten die früheren Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

Tab. 47: *Para*-Nitroanilid-Substrate zur Bestimmung einer Aminopeptidaseaktivität von DAIP

H-Ala-pNA	H-Ala-Phe-pNA	H-Val-Leu-Lys-pNA	H-Gly-Pro-pNA
H-Ala-Pro-pNA	H-Ala-Ala-pNA	H-Leu-pNA	H-Gly-Glu-pNA
H-Ala-Ala-Phe-pNA	H-Pro-pNA	H-Phe-pNA	H-Gly-Glu-pNA

3.6.5. Untersuchungen auf eine Carboxypeptidaseaktivität des DAIP

Alle bisherigen Untersuchungen zeigten, dass DAIP mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Enzym ist. Trotz beobachtbarer DAIP-Autolyse ließ sich weder eine Endoprotease- noch eine Aminopeptidaseaktivität nachweisen. Eine mutmaßliche Carboxypeptidaseaktivität von DAIP bedingt ähnliche Aminosäuresequenzen an den C-Termini von Dispase, Thermolysin oder anderen neutralen Metalloproteasen. Ein Sequenzvergleich zeigte ein identisches Motiv, Ala-Val-Gly, das bei allen neutralen Metalloproteasen konserviert ist (Abb. 54). Dieses Tripeptid ist in der Sequenz von TAMEP, die ebenfalls zur Familie der M4-Proteasen gehört, jedoch nicht von DAIP in die Autolyse gezwungen wird, nicht vorhanden (siehe unten). Aus diesem Grund wurde dieser Bereich als Erkennungssequenz von DAIP angenommen. Um die Aktivität von DAIP direkt untersuchen zu können, wurde das C-terminale Heptapeptid der Dispase synthetisiert.

Thermolysin (<i>Bacillus thermoproteolyticus</i> rokko)	..SVKQAFD AVGVK
Stearolysin (<i>Geobacillus stearothermophilus</i>)	..SVKQAFD AVGVK
Bacillolysin (<i>Bacillus cereus</i>)	..AVKQSFS AVGVN
neutrale Protease B (<i>Bacillus subtilis</i>)	..SVEKAYE AVGIL
Dispase (<i>Paenibacillus polymyxa</i>)	..AAAKSFD AVG --

Abb. 54: C-Termini von Dispase und Thermolysin sowie weiterer ausgewählter Metalloproteasen: Dargestellt sind die C-terminalen Aminosäuren der angegebenen Proteine im Einbuchstabencode. In rot dargestellt ist das homologe AVG-Motiv. Das Heptapeptid, das für weitere Untersuchungen synthetisiert wurde, ist unterstrichen.

Die Synthese des Heptapeptids erfolgte mittels Festphasensynthese in Anlehnung an das von Merrifield entwickelte Verfahren (1964). Die Synthese verlief dabei vom C- zum N-Terminus, beginnend mit C-terminalem Glycin, das

an ein polymeres Harz gekoppelt war. Jede Aminosäure wurde im vierfachen Überschuss an das wachsende Peptid gekoppelt, wobei jeder Syntheseschritt wiederholt wurde, um eine möglichst hohe Ausbeute und Reinheit des Heptapeptids zu erreichen. Der Syntheserfolg sowie die Reinheit des Produkts wurden abschließend mittels kombinierter RP-HPLC und LC-ESI-MS untersucht (Abb. 55).

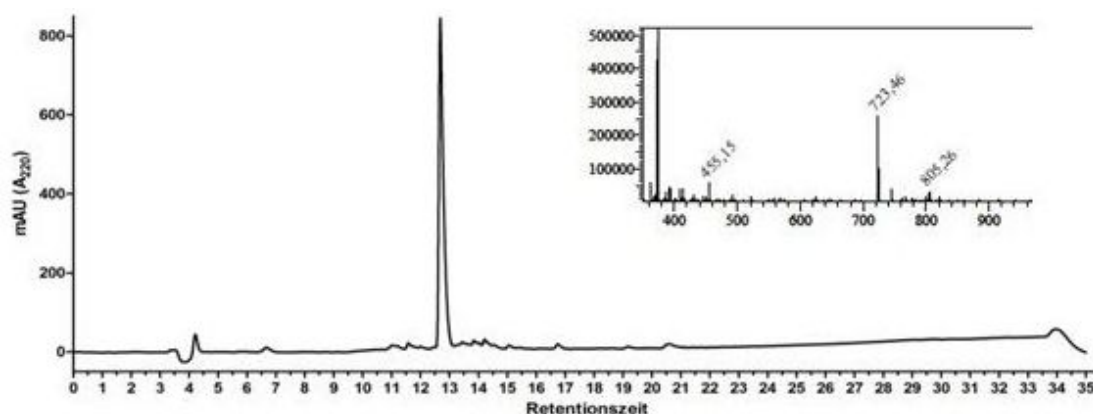


Abb. 55: RP-HPL-Chromatogramm und LC-ESI-Massenspektrum des synthetisierten Heptapeptids $\text{H}_2\text{N-KSFDVVG-COOH}$: Das Heptapeptid wurde über Festphasensynthese in Anlehnung an Merrifield, 1964 synthetisiert. Dargestellt ist das Chromatogramm von 100 μl 2.77 mM Peptidlösung in Wasser, aufgetrennt über eine präparative mit AXIA-gepackten *Phenomenex*[®] Luna 5u C18(2)-Säule. Die Elution erfolgte durch linearen Acetonitril-Gradienten von 10-100% (v/v) und 0.1% (v/v) TFA bei einem Druck von 140 bar und einer Flussrate von 1 ml min^{-1} . Aufgetragen ist die A_{220} gegen die Retentionszeit. Einschub: Positives Massenspektrum der RP-HPLC-Elutionsfraktion zwischen 12.6 und 13 min nach erneuter Auftrennung über eine *Phenomenex*[®] Jupiter[®] 5u C4-Säule. 100 μl der vorherigen Elutionsfraktion wurden aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Acetonitrilgradienten von 2-100% (v/v) und 0.1% (v/v) TFA und einer Flussrate von 0.2 ml min^{-1} über einen Zeitraum von 10 min. Aufgetragen ist die Total Ion Current-Intensität gegen das Ladungsverhältnis.

Mittels RP-HPLC konnte gezeigt werden, dass die Synthese ein Hauptprodukt erbrachte, welches zwischen 12.6 min und 13 min eluierte. Die Verunreinigungen, die sich in den kleinen Peaks über das gesamte Chromatogramm verteilt widerspiegeln, waren vernachlässigbar. Nähere Untersuchungen des eluierenden Produkts über LC-ESI-MS bestätigten abschließend den Erfolg der Synthese. Zu erwarten war eine molare Masse des Heptapeptids von rechnerisch 722.36 g mol^{-1} . Im Massenspektrum war ein einzelner Peak bei einer Momasse von 723.46 g mol^{-1} ersichtlich. Dies entsprach dem einfach positiv geladenen Molekül $[\text{M}+\text{H}]^+$. Daher wurde darauf

verzichtet, die Sequenz über Verfahren wie Edman-Abbau o.Ä. zu verifizieren. Die Produktausbeute betrug 94.1%.

Mit dem erfolgreich synthetisierten Heptapeptid wurden nachfolgend Hydrolyseversuche mit DAIP durchgeführt. Nach der Inkubation sollten anschließend mittels HPLC-ESI-MS die Fragmente bestimmt werden. Unter der Annahme, dass das Ala-Val-Gly-Motiv die Spaltstelle des DAIP darstellt, wurden die Produkte von Abb. 56 erwartet.

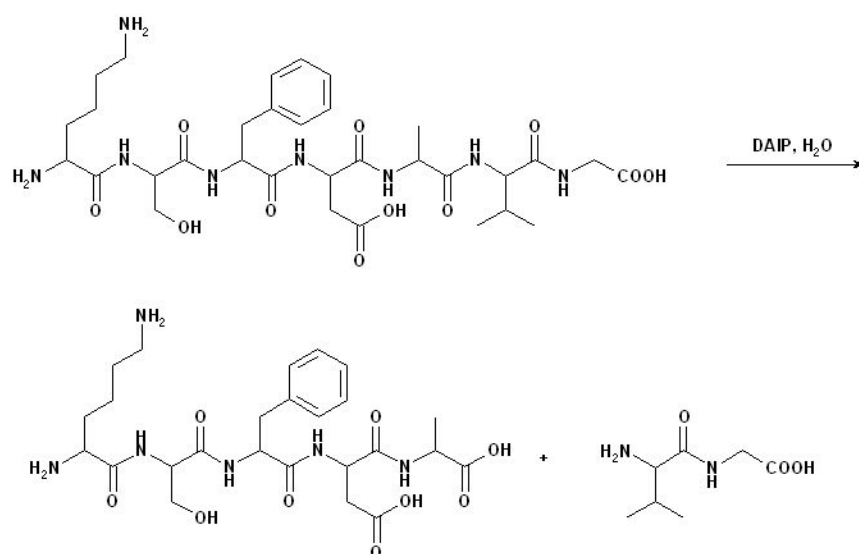


Abb. 56: Hypothetische Hydrolyse von H₂N-KSFDAVG-cooH durch DAIP: Dargestellt ist die hypothetische Hydrolyse der Peptidbindung zwischen Ala5 und Val6 durch Inkubation des Heptapeptids mit DAIP

Zur Vermeidung von Pufferbestandteilen, die den massenspektrometrischen Nachweis stören könnten, wurde der Hydrolyseversuch in Wasser durchgeführt. Vorversuche hatten gezeigt, dass weder Dispase noch DAIP in ungepufferter Mischung ihre Aktivität verloren (Daten nicht gezeigt). Die Reaktion erfolgte mit 1 mM Peptid und 1 µM DAIP für 1 h bei 37 °C bzw. 16 h bei RT unter sanfter Bewegung. Als Kontrollen dienten jeweils das Peptid und das Protein allein. Die Ergebnisse des Versuchs sind in Abb. 57 dargestellt.

Die chromatographischen und massenspektrometrischen Untersuchungen zeigten zweifelsfrei, dass es zu keiner Hydrolyse des Peptids durch DAIP gekommen war, da weder ein unterschiedliches Elutionsverhalten der Mischungen auftrat noch potentielle Spaltprodukte im Massenspektrum

detektierbar waren. Das Peptid eluierte bei dieser RP-HPLC-Säule in einem distinkten Peak zwischen 8 min und 9 min (in Abb. 57 blau markiert). DAIP hatte unter diesen Bedingungen eine Retentionszeit von ca. 13 min (Abb. 57, gelb Markierung und hervorgehobener Einschub mit Retentionszeit). Zur Bestätigung, dass das Peptid kein Substrat von DAIP ist, wurde dieses einer Autolysemischung von DAIP mit Dispase zugegeben. Eine kompetitive Hemmung war jedoch nicht erkennbar und zeigte die fehlende Carboxypeptidaseaktivität von DAIP zusätzlich an (Daten nicht gezeigt). Somit blieb der Mechanismus, mit dem DAIP die Autolyse von Dispase und Thermolysin einleitet, weiterhin unklar.

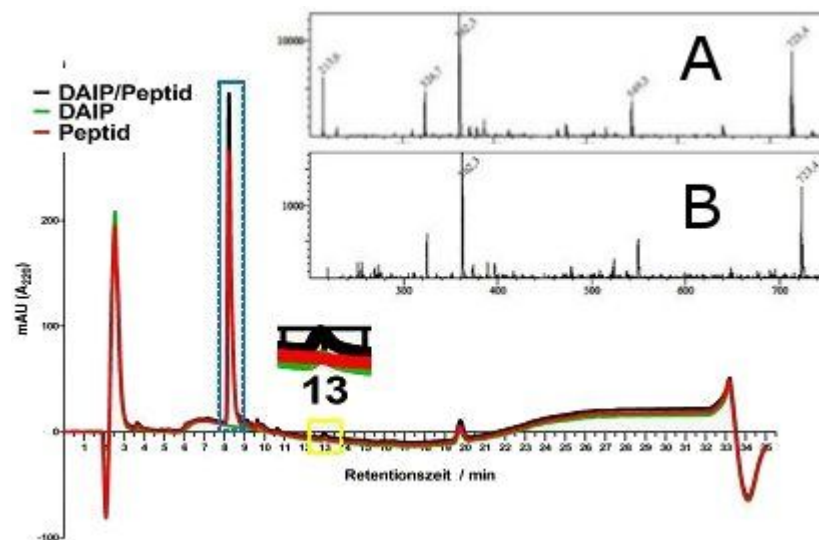


Abb. 57: RP-HPL-Chromatogramm und LC-ESI-Massenspektren der Inkubation von $\text{H}_2\text{N-KSFDVAVG-COOH}$ mit DAIP: 1 mM Peptid wurden mit 1 μM DAIP in MilliQ-Wasser für 1 h bei 37 °C inkubiert. Je 50 μl der Reaktionsmischung (schwarz) bzw. DAIP oder Peptid alleine (grün bzw. rot) wurden mittels Phenomenex® Hypersil 5 μm BDS C18-Säule chromatographisch getrennt. Die Elution erfolgte über linearen Acetonitrilgradienten von 10-100% (v/v) mit 0.1% (v/v) TFA bei 140 bar und einer Flussrate von 1 ml min^{-1} . Aufgetragen ist die A_{220} gegen die Retentionszeit. Einschub: Positive Massenspektren des Heptapeptids vor (A) und nach der Inkubation mit DAIP über 1 h bei 37 °C. Dargestellt sind die Total Ion Current-Intensitäten des Peaks zwischen 8 und 9 min der vorhergehenden RP-HPLC. 50 μl der Fraktion wurden über eine Phenomenex® Jupiter® 5u C4-Säule chromatographisch getrennt. Die Elution erfolgte über einen linearen Acetonitrilgradienten von 2-100% (v/v) mit 0.1% (v/v) TFA und einer Flussrate von 0.2 ml min^{-1} . Aufgetragen ist die Total Ion Current-Intensität gegen das m/z-Verhältnis.

3.7. Strukturaufklärung von DAIP und anderer Proteine über bioinformatische Methoden

Da eine biochemische Charakterisierung des Wirkmechanismus von DAIP nicht gelang, sollte nachfolgend untersucht werden, ob es durch Identifizierung des DAIP-codierenden Gens und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz möglich ist, das Protein einer Enzymfamilie zuzuordnen. Zusätzlich sollten die codierenden Gene weiterer Proteine, die im Rahmen der Transglutaminaseforschung der AG Fuchsbauer neben SPI und DAIP sowie der Transglutaminase selbst in den Fokus gerückt sind, identifiziert und die Proteine auf Grundlage ihrer Aminosäuresequenz charakterisiert werden. Durch die von Sarafeddinov *et al.* beschriebene Hypothese (2011), dass die TGase-Substrate als Schilde in die Hyphenhülle integriert werden, kam die Frage nach der Art weiterer Strukturproteine auf. Abschließend sollte die Art und Anzahl der Signalpeptidasen von *S. mobaraensis* bestimmt werden, da alle beschriebenen Proteine einem Transport durch die Plasmamembran unterliegen, und somit von Signalpeptidasen erkannt und prozessiert werden. Die Aufklärung der genannten codierenden Gene sowie die Charakterisierung der betreffenden Proteine auf Basis der abgeleiteten Aminosäuresequenz erfolgte über bioinformatische Methoden auf Grundlage des Genoms von *S. mobaraensis* und ist nachfolgend beschrieben. Alle diese bioinformatischen Untersuchungen ergaben den dritten Teil der vorliegenden Arbeit.

3.7.1. Sequenzierung der genomischen DNA von *S. mobaraensis*

Da die genetische wie auch die Primärstruktur von Proteinen für eine nähere Charakterisierung von erheblicher Wichtigkeit ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine 454-*De Novo* Sequenzierung des *S. mobaraensis*-Genoms durch die Firma LGC Genomics Berlin durchgeführt. Hierzu wurden Zellmasse von *S. mobaraensis* der Firma zur Verfügung gestellt, die hieraus die genomische

DNA isolierte und sequenzierte und die so erhaltenen Sequenzinformationen zu Scaffolds zusammenfasste.

Das ca. 8 Mbp-große Genom ließ sich nach dem Alignment in 1 220 Contigs unterteilen, welche wiederum zu 40 Scaffolds zusammengefasst wurden, sortiert und durchnummeriert der Größe nach von 3.0 Mb bis 2.0 kb. Deren Lage zueinander war jedoch unbekannt. Mittels lokaler tBLASTn-Analyse wurden die so erhaltenen Nukleotiddaten mit den bekannten Peptidsequenzen abgeglichen und dadurch die Gene sowie daraus abgeleitet die Primärstrukturen der Proteine entschlüsselt.

3.7.2. Weiterführende Analyse der codierenden Gene für TGase, PTP-SM und SPI

Von Transglutaminase sowie der an der TGase-Prozessierung beteiligten Prolyl-Tri/Tetrapeptidylaminopeptidase (PTP-SM) waren bereits vor Beginn dieser Arbeit die codierenden Gene und damit die vollständige Primärstruktur bekannt (Washizu *et al.*, 1994; Pasternack *et al.*, 1998; Kikuchi *et al.*, 2003; Umezawa *et al.*, 2004). Im Rahmen dieser Arbeit war es über molekularbiologische Arbeiten gelungen, das codierende Gen sowie die Aminosäuresequenz des *Streptomyces*-Papaininhibitors aufzuklären. In diesem Abschnitt werden daher nur noch weiterführende Analysen bezüglich der Anzahl, Lokalisation und Peripherie der genannten Gene vorgenommen.

3.7.2.1. Transglutaminase

Das TGase-codierende Gen von *S. mobaraensis* war bereits in den 90er Jahren vollständig entschlüsselt worden und in den Datenbanken annotiert (Washizu *et al.*, 1994; Pasternack *et al.*, 1998; Kikuchi *et al.*, 2003). Auf Grundlage der bekannten Primärstruktur wurde im Rahmen dieser Arbeit eine tBLASTn-Analyse mit der genomischen DNA durchgeführt.

Die Analyse ergab eine Lokalisation auf dem Plusstrang von Scaffold 01 in einer Einzelkopie. Vergleich mit der TGase-codierenden Sequenz aus den Datenbanken ergab eine Übereinstimmung von 100% auf Nukleotidebene. In

einer Entfernung von ca. 650 nt *upstream* des TGase-Translationsstarts befindet sich ein mutmaßliches Gen, das für eine UDP-N-Acetylglucosamin-1-carboxyvinyltransferase (TIGR01072) codiert. Diesen wird eine Aufgabe im Zellwandaufbau zugeschrieben. Ob es einen Zusammenhang zwischen den beiden Transferasen gibt, ist nicht geklärt. *Downstream* des *tgase*-Gens sind keine Gene vorhanden, die für funktionell beschriebene Proteine codieren.

Auffallend am TGase-codierenden Gen ist, dass das an Position 17 im Protein befindliche Leucin durch ein seltenes TTA-Codon codiert ist (Abb. 58). Damit steht die Translation der Transglutaminase nachweislich direkt unter Einfluss der *bld*-Kaskade, da die *bldA*-codierte UUA-tRNA für die Translation der TGase benötigt wird. Das Auftreten des entsprechenden Triplets TTA im Gensegment legt nahe, dass eine Regulierung der TGase-Biosynthese von großer Bedeutung für die bakterielle Entwicklung ist.

```

M R I R R R A L V F A T M S A V L C T A ...
ATGCGCATAC GCCGGAGAGC TCTCGTCTTC GCCACTATGA GTGCGGTGTT ATGCACCGCC ...

```

Abb. 58: N-Terminus der Transglutaminase von *S. mobaraensis*: Angegeben sind die zwanzig Aminosäuren des N-Terminus sowie die codierenden Nukleotidsequenzen. Rot markiert ist Leu17, das durch das seltene TTA-Triplett codiert wird.

3.7.2.2. Prolyl-Tri-/Tetrapeptidylaminopeptidase

Im letzten Schritt der Transglutaminaseprozessierung bei *S. mobaraensis* erfolgt die Abspaltung des N-terminalen FRAP-Tetrapeptids durch eine Aminopeptidase. Zotzel *et al.* identifizierten 2003 *via* Edman-Abbau des reifen Enzyms ein 35 aa langes N-terminales Peptid und schlugen wegen der Substratspezifität eine Bezeichnung als Tripeptidylaminopeptidase von *S. mobaraensis* (TAP-SM) vor (Zotzel *et al.*, 2003b). 2004 folgte die Aufklärung des codierenden Gens sowie eine weitere Bestimmung der Substratspezifität. Daraus abgeleitet erfolgte die bis dato gültige Nomenklatur als Prolyl-Tri-/Tetrapeptidylaminopeptidase (PTP-SM) (Umezawa *et al.*, 2004). Auf Grundlage des N-Terminus wurde im Rahmen dieser Arbeit eine tBLASTn-Analyse mit der genomischen DNA durchgeführt.

Die Analyse ergab eine einzelne Lokalisation des *ptpsm*-Gens auf dem Plusstrang von Scaffold 02 mit einer Übereinstimmung von 100% im Vergleich zu der bereits publizierten Nukleotidsequenz (Umezawa *et al.*, 2004). Flankierende Gene kodieren für eine putative Protein-L-Isoaspartat-(D-Aspartat)-O-Methyltransferase sowie einen putativen LysR-Familie-Transkriptionsregulator. Das erstgenannte Gen befindet sich wie *ptpsm* auf dem Plusstrang und endet nur 111 nt *upstream* des Transkriptionsstarts der PTP-SM. Das letztgenannte Gen liegt auf dem Minusstrang und besitzt sein Stoppcodon ca. 280 nt *downstream* hinter dem des *ptpsm*-Gens.

3.7.2.3. Streptomyces-Papaininhibitor

Die Aufklärung des SPI-codierenden Gens war im Rahmen dieser Arbeit durch molekularbiologische Methoden gelungen. Eine nähergehende tBLASTn-Analyse mit dem Genom von *S. mobaraensis* ergab eine Lokalisation des Gens auf dem Minusstrang von Scaffold 06 in einer Einzelkopie. Flankiert wird das Gen in *upstream*-Richtung auf dem Plusstrang von einer Sequenz, die für eine putative Epimerase/Dehydratase codiert, sowie in *downstream*-Richtung auf dem Minusstrang von einem putativen Phosphatase-codierenden Gen. In beiden Fällen erfolgte die Eintragung in die Datenbanken nur über Genom-Annotation, weswegen hier keine Aussage über die tatsächliche Funktion der Enzyme und daraus abgeleitet über einen potentiellen Zusammenhang mit der SPI-Aktivität getroffen werden kann.

3.7.3. Identifizierung der codierenden Gene für DAIP, SSTI und TAMEP sowie bioinformatische Charakterisierung der Proteine

Neben dem in dieser Arbeit hauptsächlich charakterisierten Papaininhibitor SPI wurden in der Arbeitsgruppe Fuchsbauer im Rahmen der Transglutaminaseforschung der vergangenen Jahre noch weitere Proteine identifiziert: der doppelköpfige Serin- und Metalloproteaseinhibitor SSTI, das Dispaseautolyse-induzierende Protein DAIP sowie die Transglutaminase-

aktivierende Metalloprotease TAMEP. Von allen genannten Proteinen waren im Vorfeld dieser Arbeit bereits die N-Termini bestimmt worden (Zotzel *et al.*, 2003a; Schmidt *et al.*, 2008; Sarafeddin *et al.*, 2009). Versuche, die Proteinsequenzen ähnlich des für den Papaininhibitor beschriebenen Verfahrens aufzuklären, scheiterten jedoch teilweise daran, dass keine Analoga in den Datenbanken verfügbar waren, oder aber *via* PCR kein Fragment erzeugt werden konnte, aus dem eine korrekte Sequenz hätte abgeleitet werden können.

3.7.3.1. *Streptomyces*-Subtilisin- und TAMEP-Inhibitor

Vom *Streptomyces*-Subtilisin- und TAMEP-Inhibitor (SSTI) war zu Beginn dieser Arbeit nur das N-terminale Peptid bekannt, und aufgrund von Homologien in diesem Bereich wurde das Protein der weit verbreiteten Familie der *Streptomyces*-Subtilisin-Inhibitoren (SSI) zugeordnet (Schmidt *et al.*, 2008). Diese weisen in vielen Aspekten Homologien auf (Mitsui *et al.*, 1977; Takeuchi *et al.*, 1991b, 1992). Ein Vertreter dieser Gruppe, dessen Primär-, -Sekundär- und Tertiärstruktur durch Sequenzierung und Kristallisation vollständig aufgeklärt ist, ist der Subtilisin-Inhibitor von *S. albogriseolus* (P01006; Ikenaka *et al.*, 1974; Mitsui *et al.*, 1977, 1979; Hirono *et al.*, 1984; Takeuchi *et al.*, 1991a). Dessen Aminosäuresequenz wurde neben dem bekannten N-terminalen Peptid wegen der hohen Homologie (Abb. 59) als Grundlage für die tBLASTn-Analyse genutzt.

```

S. mobaraensis      -----QLYAPSALVLTVGQGD----- 16
S. albogriseolus    MRNTGAGPSPSVSRPPPSAAPLSGAALAAPGDAPSALYAPSALVLTVGKGVSAATTAAPER 60
                        *****;

S. albogriseolus    AVTLTCAPGPGSGTHPAAGSACADLAAVGGDLNALTRGEDVMCPMVYDPVLLTVDGVWQGK 120

S. albogriseolus    RVSYERVFSNECEMNAHGSSVFAF 144

```

Abb. 59: Sequenzalignment der bekannten N-terminalen Aminosäuresequenz des SSTI mit dem Subtilisin-Inhibitor von *S. albogriseolus* nach Schmidt *et al.*, 2008: Das analysierte N-terminale Segment wurde mit der NCBI-Datenbank verglichen und anschließend zur Veranschaulichung durch die Online-Version der Software ClustalW2 mit der vorhandenen Primärstruktur SSI von *S. albogriseolus* aligniert. * = Seitenkette identisch; : = hohe Konservierung der Seitenkette

Die Analyse ergab für das mutmaßliche *ssti*-Gen eine Lokalisation auf dem Minusstrang von Scaffold 08 in einer einzigen Genkopie. Die Peripherie des Gens weist nur Gene für putative Proteine auf. Die Nukleotidsequenz sowie die daraus abgeleitete Primärstruktur des Inhibitors sind in Abb. 60 dargestellt.

```

M R Y I T G G I A L G S A L I L G S L V
ATGCGGTACA TCACTGGGGG GATCGCCCTG GGGTCAGCGT TGATCCTGGG CAGCCTGGTG

G A G A T A S A T P A P A P A A Q Q S L
GGGGCCGGGG CCACCGCTAG CGCGACGCCC GCGCCCGCAC CCGCCGCCCA GCAGAGCCTG

Y A P S A L V L T V G Q G D K A A S A G
TACGCACCCT CGGCACTGGT GCTCACCGTC GGCCAGGGCG ACAAGGCGGC CTCCGCCGGC

V Q R A V T L N C M P K P S G T H P D A
GTCCAGCGCG CGGTGACCCT CAACTGCATG CCCAAGCCGA GCGGCACCCA CCCGGACGCC

R G A C D Q L R A A S G N F A E I T K I
CGTGGGGCCT GCGACCAACT GCGCGCCGCG AGCGGCAACT TCGCCGAGAT CACCAAGATC

K S G T A C T K E W N P F V V T A E G V
AAGTCCGGCA CGGCCTGCAC CAAGGAGTGG AACCCTTCG TCGTGACGGC GGAGGGCGTC

W E G Q R V K Y E H T F A N P C E M K A
TGGGAAGGCC AGCGCGTCAA GTACGAGCAC ACCTTCGCCA ACCCGTGCGA GATGAAGGCG

G K G T V F E F *
GGCAAGGGCA CCGTCTTCGA GTTCTGA

```

Abb. 60: Codierende Nukleotidsequenz sowie die daraus abgeleitete Primärstruktur des *Streptomyces*-Subtilisin- und TAMEP-Inhibitors von *S. mobaraensis*

Die Analyse der abgeleiteten Primärstruktur ergab, dass SSTI nach der Biosynthese am Ribosom bzw. vor der Sekretion offensichtlich eine Länge von 148 aa und eine Molmasse von 15 170.30 Da hat (ExPASy-Peptide-Mass Calculator, Stand: Dezember 2012). Das Protein besitzt vier Cysteinreste, die möglicherweise durch Ausbildung zweier Disulfidbrücken zur beobachteten großen Thermostabilität des Proteins beitragen (Schmidt *et al.*, 2008).

Ein Vergleich mit dem durch Edman-Abbau sequenzierten N-Terminus des reifen Proteins ist nicht uneingeschränkt möglich, da nicht sicherzustellen war, ob es sich bei jener Probe nicht um einen verkürzten SSTI gehandelt hatte, da dieser von PTP-SM, einer Aminopeptidase, die an der TGase-Prozessierung beteiligt ist, N-terminal hydrolysiert wird. Eine Simulation der Signalpeptidaseerkennungsssequenz schlägt zwei mögliche Positionen vor, die auf Grundlage der Berechnungen eine ähnliche Wahrscheinlichkeit besitzen (Abb. 61): einerseits das Tripeptid Ala26-Ser27-Ala28 und andererseits das Tripeptid Ala33-Pro34-Ala35; jedoch konnte gezeigt werden, dass ein Prolinrest

in Position +1 von der Schnittstelle aus gesehen die proteolytische Spaltung durch eine Signalpeptidase verhindert (Barkocy-Gallagher und Bassford, 1992; Nilsson und von Heijne, 1992). Da SSTI an Position 36 einen Prolinrest aufweist, scheidet die letztgenannte Erkennungssequenz somit aus (Abb. 60). Daraus lässt sich schließen, dass das von Schmidt *et al.* untersuchte Protein vor der Sequenzierung sicher durch PTP-SM prozessiert worden war (Schmidt *et al.*, 2008).

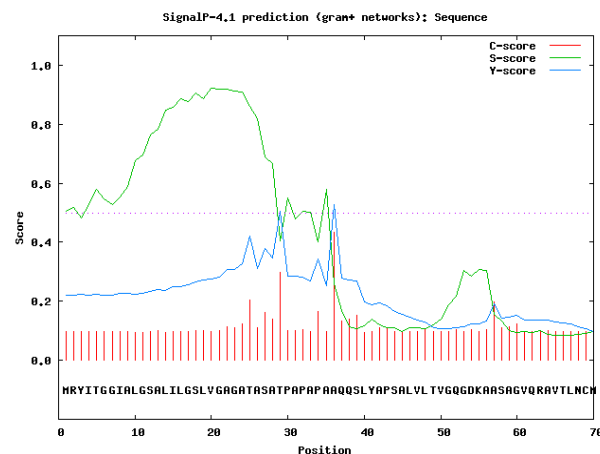


Abb. 61: Simulation der potentiellen Erkennungssequenzen für Signalpeptidasen in SSTI mittels SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/>; Stand: Dezember 2012; Petersen *et al.*, 2011): Dargestellt ist der N-Terminus des SSTI von *S. mobaraensis* im Einbuchstabencode in schwarz sowie die Werte für das C-Score (rot), S-Score (grün) und Y-Score (blau). Das C-Score gibt hierbei die vorhergesagte Schnittstelle auf Grundlage des Cleavage Site-Networks an, das S-Score steht auf Grundlage des Signal Peptide-Networks für das Signalpeptid. Das Y-Score kombiniert beide Datensätze und dient der genaueren Zuordnung.

Die Aminosäuresequenz im N-terminalen Bereich von SSTI zeichnet sich gleich durch mehrere Charakteristika aus. Das putative Signalpeptid besitzt im Vergleich zu SPI (sechs Argininreste) eine sehr kurze n-Region mit nur einem Arginin, gefolgt von zwei polaren, aber neutralen Aminosäuren in Form von Tyrosin und Threonin. Bereits dann beginnt die unpolare h-Region. Mit Ala26-Ser27-Ala28 als Erkennungssequenz für die Signalpeptidase besitzt das sekretierte Protein noch eine Länge von 120 aa und eine Molmasse von 12 596.26 Da (ExPASy-Peptide-Mass Calculator, Stand: Dezember 2012). Reifer SSTI weist abgeleitet von der Primärstruktur einen theoretischen pI von 8.4 auf (ExPASy-Peptide-Mass Calculator, Stand: Dezember 2012). Schmidt *et al.* bestimmten einen Wert von ca. 9.0, der im Verlauf der Kultivierung

wahrscheinlich durch Modifikation der Glutaminseitenketten etwas absinkt (Schmidt *et al.*, 2008).

Ein Abgleich der vollständigen Aminosäuresequenz des SSTI mit der NCBI-Datenbank zeigte Homologie zu Mitgliedern der SSI-Familie unterschiedlicher *Streptomyces*-Arten (Abb. 62). Die fünf *Streptomyces*-Proteine mit dem niedrigsten e-Value und damit der höchsten Vergleichbarkeit sind in Tab. 48 dargestellt (Oda *et al.*, 1996; Taguchi *et al.*, 1997; Han *et al.*, 2012). Ebenfalls sind die Größen der Proteine annähernd mit der des (reifen) SSTI vergleichbar.

<i>S. mobaraensis</i>	---MRYITGGIALGSALILGSLVGAGATASATPAPAPAAQQSLYAPSALV 47
<i>S. luteovorticillatus</i>	-----YAPSALV 7
<i>S. eurocidicus</i>	-----YAPSALV 7
<i>S. auratus</i>	MFVMRYITGAVALGAALVLGGLATSAQAVAAPAQSG--RSGGLYAPSELV 48
<i>S. orinoci</i>	-----SLYAPSALV 9
<i>S. platensis</i>	---MRYITGAVALGAALVLGTLATTAQA--AAPAQPAA--RTGGLYAPTELV 44
	*****::***.***::* *: * * * : ****: **
<i>S. mobaraensis</i>	LTVGQGDKAASAGVQRAVTLNCPKP SGTHPDARGACDQLRAASGNFAEI 97
<i>S. luteovorticillatus</i>	LTIGQGD SAATAGVQRAVTLTCTPKAAGSHPNTPSGACAQLRLSNGDFDKL 57
<i>S. eurocidicus</i>	LTIGQGATAAESGVQRAVTLTCTPKS SGTHPDAGKACTQLRAAGGDFDKV 57
<i>S. auratus</i>	LTVGQGASRATATVQRAVTLTCTPKAGGSHPNPIAACDQLRTVAGDFNAV 98
<i>S. orinoci</i>	LTIGQGD-SASAGI QRAVTLSCMPTP SGTHPDARDACAQLRQADGKFDEL 58
<i>S. platensis</i>	LTVGQGESRATATVQRAVTLSCMPGARGSHPNPLGACTQLRAVAGDFNAI 94
	::* * : :*****.* * . *::*:. ** *** *.* :
<i>S. mobaraensis</i>	TKIKSGTACTKEWNPFFVVTAEGVWEGQVRVKEHTFANPCEMKAGKGTVE 147
<i>S. luteovorticillatus</i>	VKIKDGTMC TREWNPSTVTAEGVWEGRRVSFEHTFANPCEMKAGKGTVE 107
<i>S. eurocidicus</i>	TRIKSDTVCTKEWNPFTVVTAEGVWDGRRISYEHTFANPCMAKAGKGLVE 107
<i>S. auratus</i>	TAAPSQRLCTKEWAPIVVTADGVWQGKRVSYSYTFANPCAMTDGRGSVFD 148
<i>S. orinoci</i>	TATKAGTYCTKEWNPVTVTATGVWEGQVRVNSHTFGNPCMAKAAKSTVFS 108
<i>S. platensis</i>	TAATSDRLCTKEWNPVVTADGVWQGKRVSYSYTFANRCMNIDSDTVFN 144
	. **::** * .*** ***::*::*::*::* * . . **.
<i>S. mobaraensis</i>	F 148
<i>S. luteovorticillatus</i>	F 108
<i>S. eurocidicus</i>	F 108
<i>S. auratus</i>	F 149
<i>S. orinoci</i>	F 109
<i>S. platensis</i>	F 145
	*

Abb. 62: Sequenzalignment der vollständigen Aminosäuresequenz des SSTI mit den fünf Proteinen, die im Datenbankvergleich die höchste Homologie zeigten: Die Aminosäuresequenz des SSTI wurde mit der NCBI-Datenbank verglichen und anschließend zur Veranschaulichung durch die Online-Version der Software ClustalW2 aligniert. * = Seitenkette identisch; : = hohe Konservierung der Seitenkette; . = niedrige Konservierung der Seitenkette

Auffallend an den homologen Proteinen ist, dass es sich bei *S. luteovorticillatus*, *S. eurocidicus* und *S. orinoci* um Organismen handelt, die wie *S. mobaraensis* ehemals der Gattung *Streptoverticillium* zugeordnet waren. Ob es sich bei diesen Bakterien ebenfalls um Transglutaminaseproduzenten handelt, ist jedoch nicht beschrieben. Vergleich der Primärstruktur hinsichtlich

der Anzahl an Lysin- und Glutaminresten zeigen, dass die Proteine der drei genannten ehemaligen Streptovercillien eine ähnlich hohe Anzahl an Lysinresten aufweisen wie SSTI (8x Lys, 6x Gln), wohingegen die beiden Streptomyceten deutlich weniger derartige Reste besitzen. Bezüglich der Glutaminreste ist jedoch eher ein gegenläufiger Trend festzustellen (Tab. 48).

Tab. 48: Ergebnis des NCBI-Datenbankvergleichs mit der aufgeklärten Primärstruktur von SSTI: Aufgeführt sind die fünf Proteine, die im Bezug auf das e-Value den kleinsten und somit besten Wert aufweisen. Ebenfalls aufgeführt ist die Identität mit SSTI, die Länge sowie die Anzahl an Lysin- (K) und Glutaminseitenketten (Q) der betreffenden Proteine

Protein	Stamm	e-Value	Identität	Länge	K	Q
Protease inhibitor SIL-V5 (P80600)	<i>S. luteovercillatus</i>	$5 \cdot 10^{-55}$	74%	108 aa*	6	3
Protease inhibitor SIL-V3 (P80598)	<i>S. eurocidicus</i>	$4 \cdot 10^{-55}$	76%	108 aa*	7	3
Protease Inhibitor protein (J1ZND6)	<i>S. auratus</i> AGR0001	$3 \cdot 10^{-53}$	58%	149 aa	3	6
Protease Inhibitor SIL-V2 (P80597)	<i>S. orinoci</i>	$4 \cdot 10^{-53}$	75%	109 aa*	5	5
Kexstatin-1 (O33702)	<i>S. platensis</i>	$4 \cdot 10^{-50}$	67%	145 aa	2	5

* = reifes Protein

Wie für SPI wurde auf Grundlage der Aminosäuresequenz eine Vorhersage der Sekundärstruktur über den PHYRE2-Server sowie ein Alignment anhand bekannter Kristallstrukturen aus der *Protein Data Base* mit derselben Software durchgeführt. Der so erhaltene putative Aufbau des Proteins ist in Abb. 63 dargestellt (Kelley und Sternberg, 2009).

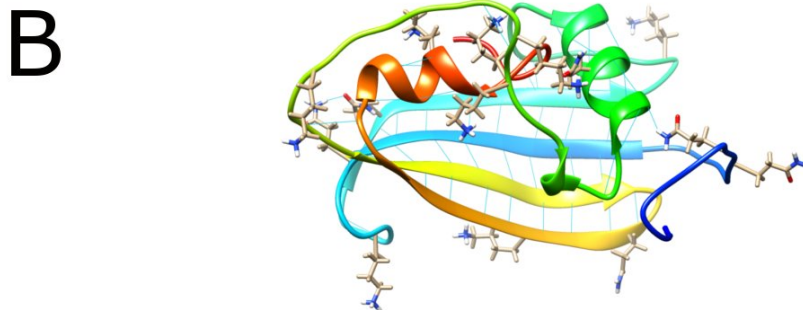
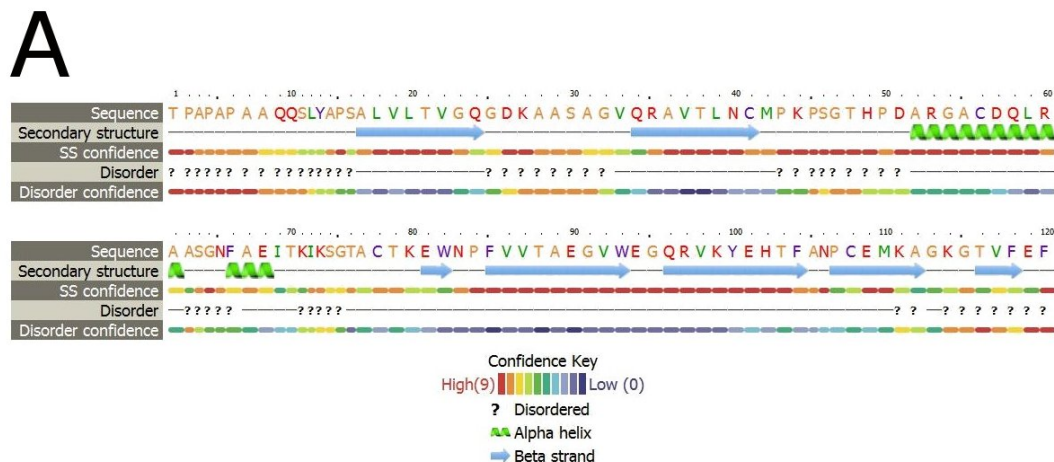


Abb. 63: Vorhersage der putativen Sekundär- (A) und Tertiärstruktur (B) des SSTI von *S. mobaraensis*: A: Dargestellt sind die auf Grundlage der Aminosäuresequenz über dem PHYRE2-Server vorhergesagten Sekundärstrukturelemente. Die Farbgebung stellt die Verlässlichkeit der Vorhersage dar (siehe Legende) (Kelley und Sternberg, 2009). B: Dargestellt ist die Vorhersage der Tertiärstruktur (blau = N-Terminus, rot = C-Terminus). Das Modell wurde auf Grundlage der mittels PHYRE2 vorhergesagten Sekundärstrukturen und Abgleich mit Kristallstrukturen aus der Protein Data Base (PDB; www.pdb.org, Stand: Januar 2013) erstellt und anschließend mit der Software Chimera 1.4.1 visualisiert. In hellblau eingezeichnet sind die putativen H-Brücken. Außerdem eingezeichnet ist die Lage der Lysin- und Glutaminreste im Protein. Auf eine Einbeziehung möglicher Cystinbrücken wurde verzichtet.

Reifer SSTI weist der *in silico*-Analyse nach als Strukturmerkmale zwei α -Helices und sieben β -Faltblätter auf (Abb. 63B). Das Protein besitzt sechs Glutamin- und acht Lysinreste, die potentiell für eine Verknüpfung durch Transglutaminase zur Verfügung stehen. Hierbei fällt besonders das Dipeptid Gln9-Gln10 auf, das im N-Terminus des reifen Proteins auftritt. Die Affinität von Transglutaminase gegenüber solchen Aminosäuredubletts ist besonders hoch (Ando *et al.*, 1989; Candi *et al.*, 1995; Hohenadl *et al.*, 1995; Christensen *et al.*, 1996), wodurch es sehr wahrscheinlich ist, dass hier der entsprechende Angriffspunkt des Enzyms für die Verknüpfung ist. Hier suggeriert das Modell

jedoch, dass nur die Seitenkette von Gln10 frei zugänglich zu sein scheint. Die Amidgruppe von Gln9 scheint über Wasserstoffbrücken an das Peptidrückgrat der α -Helix zwischen Ala52 und Ala61 gebunden zu sein. Ebenfalls zugänglich scheinen Gln58 und Gln96 zu sein. Gln24 und Gln34 fixieren sich gegenseitig über H-Brücken.

Von acht Lysinresten stehen mutmaßlich nur Lys44 und Lys73 für eine Reaktion mit Transglutaminase zur Verfügung. Die basischen Reste der verbleibenden sechs Lysine weisen alle einen sauren Glutamy- oder Aspartylrest in direkter Nachbarschaft auf. Hierdurch scheint es aufgrund des Modells wahrscheinlich, dass Lys27-Asp26, Lys71-Glu109, und Lys80-Glu81 Ionenpaare bilden. Glu119 wäre räumlich in der Lage, sowohl Lys111 als auch Lys114 zu fixieren, während Lys99 sogar von zwei Glutamyresten, Glu90 und Glu101, fixiert sein könnte.

SSTI ist neben ScNPI von *S. caespitosus* das einzige beschriebene Mitglied der SSI-Familie, das neben der Subtilisin- noch eine Metalloprotease-Bindestelle aufweist (Hiraga *et al.*, 2000). Es ist jedoch auch bei diesem Protein bisher nicht gelungen, die dafür verantwortlichen Aminosäuren zu identifizieren. Ein Vergleich mit der Tertiärstruktur des *Streptomyces* Metalloproteinaseinhibitors SMPI von *S. nigrescens* TK-23 lässt keine Homologien erkennen. Dieser besitzt die Bindestelle in einer Schleife um Cys64 (Seeram *et al.*, 1997; Hiraga *et al.*, 1999). Eine Strukturhomologie in dem entsprechenden Bereich ist jedoch mit dem SSI von *S. albogriseolus* nicht auszumachen, der an der vergleichbaren Stelle eine Helix ausbildet (Mitsui *et al.*, 1979; Hirono *et al.*, 1984). Daher ist eine Aussage über die Lokalisation der TAMEP-Bindestelle bei SSTI vorerst nicht möglich.

Um weitere Informationen über SSTI-Merkmale zu erhalten, wurde zusätzlich zum bereits beschriebenen ein weiterer Datenbankabgleich ohne die Gattung *Streptomyces* durchgeführt (Tab. 49). Ein Vergleich der Homologiewerte von SSTI mit *Streptomyces*-Proteinen und solchen, die von anderen Organismen stammen, zeigte wie erwartet stärkere Homologien zu den Mitgliedern der SSI-Familie als zu den stammfremden Proteinen. Auffallend

ist jedoch, dass es sich bei allen fünf verwandten Proteinen mit der größten Homologie um Produkte von Bakterien der Ordnung *Actinomycetales* handelt, zu der auch *Streptomyces* gehören. Keines der Proteine ist jedoch tatsächlich experimentell bestätigt und charakterisiert, sondern nur nach Genomsequenzierung annotiert. Daher kann keine Aussage über ihre biologische Funktion getroffen werden.

Tab. 49: Ergebnis des NCBI-Datenbankvergleichs unter Ausschluss von *Streptomyces* mit der aufgeklärten Primärstruktur von SSTI: Aufgeführt sind die fünf Proteine, die im Bezug auf das e-Value den kleinsten und somit besten Wert aufweisen. Ebenfalls aufgeführt ist die Identität mit SSTI sowie die Länge der betreffenden Proteine

Protein	Stamm	e-Value	Identität	Länge
Protease inhibitor protein (YP_006811846)	<i>Nocardia brasiliensis</i> ATCC 700358	$8 \cdot 10^{-17}$	41%	138 aa
Protease inhibitor protein (ZP_08883617)	<i>Saccharopolyspora spinosa</i> NRRL 18395	$3 \cdot 10^{-16}$	42%	133 aa
Hypothetical protein (D2AW17)	<i>Streptosporangium roseum</i> DSM 43021	$2 \cdot 10^{-15}$	45%	133 aa
Proteinase inhibitor I16- Subtilisin-type inhibitor (D1A6I1)	<i>Thermomonospora curvata</i> DSM 43183	$2 \cdot 10^{-15}$	37%	137 aa
Subtilisin inhibitor-like protein (H5X6E3)	<i>Saccharomonospora marina</i> XMU15	$6 \cdot 10^{-14}$	35%	122 aa

3.7.3.2. Dispaseautolyse-induzierendes Protein

Vom Dispaseautolyse-induzierenden Protein (DAIP) waren zu Beginn dieser Arbeit ausschließlich die ersten 23 Aminosäuren des N-Terminus bekannt (Sarafeddinov *et al.*, 2009), und ein Sequenzabgleich dieses Peptids mit der NCBI-Datenbank erbrachte weder bei *Streptomyces* noch bei anderen Organismen ein homologes Protein. Die weiterführende Charakterisierung des Proteins war ein Teil dieser Arbeit. Dahingehende Versuche, das codierende Gen über Southern Blot-Analyse mithilfe einer Sonde, die auf Grundlage der N-terminalen Sequenz abgeleitet wurde, zu identifizieren, scheiterten jedoch im

Verlauf an unselektiver DNA-Hybridisierung. Durch die tBLASTn-Analyse auf Basis des sequenzierten Genoms von *S. mobaraensis* hingegen ließ sich das mutmaßliche *daip*-Gen vollständig aufklären und daraus die Primärstruktur vervollständigen.

Die Analyse ergab für das putative *daip*-Gen eine Lokalisation auf dem Minusstrang von Scaffold 05 in einer einzigen Genkopie. Ebenso wie beim *ssti*-Gen befinden sich im direkten Umfeld des *daip*-Gens nur Gene, die für putative Proteine codieren. Im Gegensatz zu den *ssti*- und *spi*-Genen zeichnet sich das *daip*-Gen mutmaßlich durch einen alternativen Transkriptionsstart aus. Während das N-terminale Methionin bei SSTI und SPI durch ein ATG-Codon codiert ist, geschieht dies für DAIP über ein GTG-Triplett. Die Nukleotidsequenz des *daip*-Gens sowie die daraus abgeleitete Primärstruktur sind in Abb. 64 dargestellt.

Zur Verifizierung der Aminosäuresequenz des reifen Proteins wurden am Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut der Universität Tübingen (NMI) ein tryptischer In-Gel-Verdau nach Shevchenko *et al.* (2006) mit anschließender HPLC-ESI-UHRTOF-MS-MS-Analyse durchgeführt. Hierbei wurden 169 von 348 aa bestätigt, was einer Sequenzabdeckung von 48.6% entsprach (in Abb. 64 unterstrichen).

Nach der Biosynthese am Ribosom besitzt DAIP eine Länge von 374 aa und eine Molmasse von 38 810.90 Da (ExPASy-Peptide-Mass Calculator, Stand: Dezember 2012). Der Vergleich mit dem durch Edman-Abbau analysierten N-Terminus ergab, dass das Translationsprodukt ein putatives N-terminales Signalpeptid mit einer Länge von 26 aa (einschließlich Methionin) besitzt. Wie SSTI besitzt DAIP nur einen Argininrest in der n-Region des Signalpeptids, dessen Aufbau wie bei den bereits betrachteten Proteinen ebenfalls für einen Transport über den Sec-Signalweg spricht. Nach der Abspaltung des Signalpeptids hinter dem Tripeptid Ala24-Gln25-Ala26 besitzt das reife Protein noch eine Molmasse von 36 152.73 Da (ExPASy-Peptide-Mass Calculator, Stand: Dezember 2012) und stimmt damit annähernd mit der apparenten

Molmasse von 37 kDa überein. Dem experimentell bestimmten pI von 7.1-7.2 (Sarafeddin *et al.*, 2009) steht ein theoretischer Wert von 5.29 gegenüber.

```

M K R M G W A V T A A V T T I V L A Q S
GTGAAGCGGA TGGGATGGGC CGTCACCGCG GCCGTCACCA CCATCGTCCT GGGCCAGTCG

S L A A Q A A D S T S G W R A P S C T K
TCCCTCGCCG CCCAGGCGGC GGACTCCACC TCCGGGTGGC GGGCCCCCTC GTGCACCAAG

V T G D G A V T F T T D D G A T L A P T
GTCACCGGTG ACGGCGCCGT CACCTTCACC ACCGACGACG GTGCCACCCT CGCCCCGACG

T G T L Q S V S Y T H G L V A L D T P N
ACGGGCACCC TGCAGTCCGT CAGCTACACC CACGGCCTGG TCGCGCTGGA CACCCCCAAC

T L L A T H N D E L Q R S T D A G C T W
ACCCTGCTCG CCACGCACAA CGACGAGCTC CACGCTCGA CGGACGCGGG CTGCACCTGG

T K V A T L G S G S T W L T A A T G G R
ACCAAGGTCG CGACCCTGGG CAGCGGCTCC ACCTGGCTCA CCGCCGCCAC CGGCGGCGCG

A F A W E K N G G Y L A R V D G R T V T
GCCTTCGCTT GGGAGAAGAA CGGCGGCTAC CTCGCCC GCG TCGACGGCAG AACCGTCACC

K L S S P S A D I V G V G T D K A R R D
AAGCTGTCTT CGCCAGCGC CGACATCGTC GCGCTCGGCA CCGACAAGGC GCGCCGCGAG

H V R L A G S D G Q L Y D S T D A G A T
CAGTCCGCC TCGCCGGCAG CGACGGACAG TTGTACGACT CGACGGACGC GGGCGCCACC

W K P L G K L A F G P G A S V Y T V S F
TGGAAGCCGC TCGGCAAGCT CGCCTTCGGC CCGGGGGCGA GCGTCTACAC CGTGTCTTTC

D P A D L D H A V A G G M T T G G A V T
GACCCGGCCG ACCTCGACCA CGCGGTGCGC GGCGGCATGA CGACCGGCGG CGCGGTACCC

T D G G A T W T A A T G L S A T A G G K
ACCGACGGCG GCGCCACCTG GACCGCGCC ACCGGCCTGT CCGCCACGGC CGGCGGCAAG

S N L F A A S V S P A D R N V V Y A L G
TCAACCTCT TCGCGGCGTC CGTCTCCCG GCGACCGCA ACGTCGTCTA CGCCCTGGG

I D L V E A A P N S G A E G R H L Y R S
ATCGACCTCG TCGAGGCGCG GCCCAACTCG GGCGCCGAGG GCGGCACCT GTACCGGTCC

T D G G R T Y T R I V D D T P D T E L T
ACCGACGGCG GCCGGACGTA CACCCGATC GTCGACGACA CCGCGGACAC CGAACTACCC

N S T L L A P S P V D P N V L Y F E Y G
AACAGCACCC TGCTGGCGCC CAGCCCGGTG GACCCCAACG TCCTCTACTT CGAGTACGGC

T Y F Q A Y G T D L Y R Y D A R T G K V
ACGTACTTCC AGGCGTACGG CACCGACCTG TACCGCTACG ACGCGCGGAC GGGCAAGGTC

G K T H N A H D G I S A I A F N P A R P
GGCAAGACGC ACAATGCCCA CGACGGCATC TCGGCCATCG CCTTCAACCC GCGCGGCGCG

S V M Y L G L E E V Q I H H *
TCCGTGATGT ACCTGGGTCT GGAAGAGGTG CAGATCCACC ACTGA

```

Abb. 64: Codierende Nukleotidsequenz sowie die daraus abgeleitete Primärstruktur des Dispaseautolyse-induzierenden Proteins von *S. mobaraensis*: Dargestellt ist die Nukleotidsequenz sowie daraus abgeleitet die Aminosäuresequenz im Einbuchstabencode. Unterstrichen ist der Bereich, der durch HPLC-ESI-UHRTOF-MS-MS-Untersuchungen bestätigt wurde.

DAIP weist nur eine geringe Hitzestabilität auf. Bereits bei einer Inkubation für 20 min bei 70 °C ließ sich keine Aktivität mehr nachweisen (Sarafeddin *et*

al., 2009). Die Primärstruktur des Proteins weist nur zwei Cysteinseitenketten auf, die sich beide im ersten Viertel des reifen Proteins befinden. Untersuchungen deuteten darauf hin, dass diese eine Cystinbrücke bilden (siehe oben). Eine definitive experimentelle Bestätigung steht jedoch noch aus. Die Tatsache, dass es im Rahmen der Edman-Sequenzierung nicht möglich war, den Cysteinrest im N-Terminus zu analysieren, spricht ebenfalls für das Vorhandensein der Disulfidbrücke (Sarafeddinov *et al.*, 2009).

Da ein Datenbankabgleich auch mit der vollständigen Aminosäuresequenz weder bei *Streptomyces* noch bei anderen Organismen homologe Proteine ergab, lassen sich auch auf dieser Grundlage keine weiteren Aussagen über einen möglichen Wirkmechanismus oder die genaue Funktion des Proteins im Lebenszyklus von *S. mobaraensis* machen.

Wie für SPI und SSTI wurde auch für DAIP auf Grundlage der Aminosäuresequenz eine Vorhersage der Sekundärstrukturen durchgeführt und daraus die putative Tertiärstruktur über den PHYRE2-Server modelliert (Kelley und Sternberg, 2009). Diese ist in Abb. 65 dargestellt.

Reifes DAIP weist eine *7-bladed-beta-propeller*-Struktur, aufgebaut aus sieben sehr einheitlichen Sekundärstrukturen, auf. Diese Strukturen sind gleichmäßig um eine zentrale Achse angeordnet und bestehen jeweils aus drei oder vier β -Faltblättern, die wiederum zueinander antiparallel angeordnet sind. Nach Auswertung der *Structural Classification of Proteins*-Datenbank zeigte sich, dass dieses Strukturmotiv in Proteinen vollkommen unterschiedlicher Funktion auftritt (<http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/>; Stand: Februar 2013). Somit ist auf dieser Grundlage keine funktionelle Zuordnung des DAIP möglich. Zusätzlich zur beschriebenen Propeller-Struktur besitzt das Protein am C-Terminus einen Fortsatz, der ebenfalls aus zwei antiparallelen β -Faltblättern aufgebaut ist.



Abb. 65: Vorhersage der putativen Sekundär- (A) und Tertiärstruktur des DAIP (B) von *S. mobaraensis*: A: Dargestellt sind die auf Grundlage der Aminosäuresequenz über dem PHYRE2-Server vorhergesagten Sekundärstrukturelemente. Die Farbgebung stellt die Verlässlichkeit der Vorhersage dar (siehe Legende) (Kelley und Sternberg, 2009). B: Dargestellt ist die Vorhersage der Tertiärstruktur (blau = N-Terminus, rot = C-Terminus). Das Modell wurde auf Grundlage der mittels PHYRE2 vorhergesagten Sekundärstrukturen und Abgleich mit Kristallstrukturen aus der Protein Data Base (PDB; www.pdb.org, Stand: Januar 2013) erstellt und anschließend mit der Software Chimera 1.4.1 visualisiert. In rot eingezeichnet sind die putativen H-Brücken. Außerdem eingezeichnet ist die Lage der Lysin- und Glutaminreste sowie der putativen Disulfidbrücke (gelb).

Das Protein besitzt fünf Glutamin- und zehn Lysinreste, die als potentielle Transglutaminasebindstellen zur Verfügung stehen (Abb. 65B). Auf Grundlage der putativen Struktur des Proteins wurden, wie schon für SPI und SSTI

geschehen, rein hypothetische *in silico*-Untersuchungen hinsichtlich der räumlichen Anordnung der betreffenden Aminosäuren angestellt. Hierbei zeigte sich, dass von den fünf Glutaminresten womöglich nur zwei, Gln144 und Gln345, für eine Reaktion mit TGase zur Verfügung stehen. Während Gln39 und Gln65 sich wahrscheinlich durch Ausbildung von H-Brücken gegenseitig fixieren, scheint dies bei Gln298 mit Peptidbindungen des Peptidrückgrats zu geschehen. Von den zehn potentiell verfügbaren Lysinresten stehen ebenfalls mutmaßlich nur drei, Lys115, Lys160 und Lys214, für eine Reaktion mit TGase zur Verfügung. Für die verbleibenden sieben Lysinreste konnte in der direkten Nachbarschaft jeweils ein saurer Aspartyl- oder Glutamylrest ausgemacht werden, der den basischen Lysinrest über Salzbrücken fixieren könnte. So könnten die Paare Lys14-Glu292, Lys76-Glu63, Lys100-Asp122, Lys130-Asp129, Lys156-Asp147, Lys313-Asp270 sowie Lys316-Asp26 ionisch miteinander verknüpft sein, wodurch ebenfalls eine Umsetzung durch TGase nicht möglich wäre. Da zum Zeitpunkt dieser Arbeit kein konkreter Hinweis für eine mögliche Klassifizierung des DAIP vorlag, konnte an dieser Stelle auch keine Vermutungen über eine bevorzugte Orientierung des Proteins getroffen werden.

3.7.3.3. Transglutaminase-aktivierende Metalloprotease

Ebenso wie bei SPI, SSTI und DAIP war von der Transglutaminase-aktivierenden Metalloprotease (TAMEP) zu Beginn dieser Arbeit nur das 18 aa lange N-terminale Peptid des reifen Enzyms bekannt, welches starke Homologie zur fuktionell charakterisierten Zinkprotease SGMPII von *S. griseus* (Q9R5Q0; Tsuyuki *et al.*, 1991; Kojima *et al.*, 1998) aufweist (Zotzel *et al.*, 2003a). Da von dieser jedoch ebenfalls nur der N-Terminus in den Datenbanken verfügbar ist, wurde zur Detektion des *tamep*-Gens die Aminosäuresequenz der ebenfalls verwandten Metalloprotease Griselysin von *S. griseus subsp. griseus* NBRC 13350 (B1W035; Ohnishi *et al.*, 2008) genutzt und *via* tBLASTn-Analyse mit den Genomdaten verglichen.

Auf diese Weise konnten insgesamt drei putative Gene identifiziert werden, die für Griselysin-Analoga codieren. Alle drei befinden sich auf dem Plusstrang

von Scaffold 01, wobei das erste Gen nur ca. 200 nt *upstream* des zweiten in derselben Leserichtung liegt, was auf einen entsprechenden Protease-Cluster hindeuten könnte. Das dritte Gen befindet sich ca. 850 kb *downstream* ebenfalls auf dem Plusstrang (Abb. 66). Genauere Analysen der Einzelsequenzen ergaben, dass nur das erstgenannte Gen für ein Protein codiert, das den von Zotzel *et al.* ermittelten N-Terminus aufweist. Aus diesem Grund wurde dessen Translationsprodukt eindeutig als TAMEP identifiziert. Die beiden homologen Enzyme werden nachfolgend in Anlehnung an die von Tsuyuki *et al.* genutzte Nomenklatur der *Streptomyces griseus* Metalloprotease I und II (SGMPI und SGMP II; Tsuyuki *et al.*, 1991) als *Streptomyces mobaraensis* Metalloprotease I und II (SmMPI und SmMP II) bezeichnet (Abb. 67). Alle drei proteasecodierenden Leserahmen scheinen nicht mit einem klassischen ATG-Codon zu beginnen. Die putativen Transkriptionsstarts der TAMEP sowie der SmMPI weisen ein GTG-Codon auf, wohingegen das *smmpII*-Gen allem Anschein nach mit einem CTC-Codon beginnt.



Abb. 66: Genetische Organisation der *tamep*-, *smmpi*- und *smmpII*-Gene im Genom von *S. mobaraensis*: Dargestellt ist die Anordnung der Gene (rot) zueinander auf dem Genom von *S. mobaraensis* (grau). Der gestrichelte Bereich stellt einen Abschnitt von ca. 850 kb dar, der zwischen den Genen *smmpi* und *smmpII* liegt. Alle anderen Größen sind in Relation zum angegebenen Maßstab zu sehen.

Nach einem Datenbankabgleich der Primärstrukturen der drei Proteine können alle, wie für TAMEP bereits experimentell geschehen (Zotzel *et al.*, 2003a), der Familie der M4-Proteasen zugeordnet werden. TAMEP ist mit einer Länge von 760 aa und einer Molmasse von 79 181.45 Da nach der Biosynthese am Ribosom über 40% länger als die beiden homologen Enzyme (SmMPI: 518 aa, 55 268.95 Da; SmMP II: 536 aa, 55 971.94 Da), was sich speziell im verlängerten C-Terminus bemerkbar macht. Die beiden SmMP hingegen haben eine ähnliche Länge und Molmasse (Abb. 67).


```

TAMEP      MR--PTPQR--RAVATGALVA-----VTAMLAVGVQTTSANAGQDKAAHPAPRQSIHKPD
SmMPI      MR--HTPRIARSGSRRPAVAASAATVAAALLASGFA-----
SmMPII     MRLTATPRT--TALRAAALVA-----SAAMVVVGVTGSASASGD-----RD
          **  **:      .      *:.*      :*:.. *.

TAMEP      PGAEPVKLTSPQRAELIRDANATKAETAKNLGLGAKEKLVVKDVVKDKNGTLHTRYERTY
SmMPI      -----GAPAQAAGQEDPAKALHLSGKERLVPRGTVTDEDGTVHTRYERTY
SmMPII     SGGPLPLTSLASQRTAAIQEAQSGASATAAKIGLSGKEKLIARDVVKDADGTVHTRYERTY
          :          *      :*.**:*: : *. * :*:*****

TAMEP      DGLPVLGGDLVVDATRSQGVKTAATKQRIAVASTTPSLAASAAEKDAVKAARAKGSKA
SmMPI      EGLPVLGGDLVVHQDKQKVEDVTKAVEAAIKVPTTKAKI SAPAARRQAMLASADEGAGA
SmMPII     DGLPVLGGDLIVHEAKAGRSVTKA--NDATIALPSTDASLAPAAAKKSALSAAA-DQKTA
          :*****:*. : *: : . * : * :*: **:*. *: . *

N-Term Zotzel
TAMEP      GKADKAPRKVVWAAKGTPVLAYETVVGGVQDDGTPSQLHVITDAKTGKKLFEFQGVKQGT
SmMPI      FISNQAPRKVVWAAKGTPVLAYETVVGGVQDDGTPSELHVVTDATTKKKLDEFQAIATGT
SmMPII     KADGQAPRKVVWAAQKGPVLAYETVVTGVQKDGTPSELHVITDAASGKKLYQYEAJETGT
          :*****:*.***** *:*.*****:***:*** :*** :*:.. **

N-Term Zotzel
TAMEP      GNSQHSQGQVQIGTTKS
SmMPI      GNSQHSQGQVQIGTTKSGSSYQMNDDTRGGHKTYNLNHGSSGT-GTLETDSDDVWNGTNS
SmMPII     GTGMYNGKVPVNSVKSGGRFYMKDQGRGGHTTFHAQNKKSSESFPFASNTRDVWNGKQS
          GTSTYSGTVPPLTTTKSGSQYQLNDGARGGHKTYDLNQGTSGT-GSLFTNSTDTWGGGRQ-
          *. . :.* * : :.***. : :* ****. *. . :. **. *: : *.** * :

TAMEP      DPATAGVDAHGAQLTWDYYKNVHGRNGIRGDGVGAYSRVHYGNVYNAFWDDSCFCMTY
SmMPI      MAQTAAVDAQYGAAMTWDYYKNVLGRKGIKNGKAANSFVHYGNNGYNAFWSDSCFCMVY
SmMPII     ---TAGVDAHGAAVTWDFYKNVGRNGIRNDGKAAYS RVHYGNSYVNAFWSDSCFCMTY
          **.**:*** :***:*** ***:*: :* . * * ***** * ****.*.***.*

TAMEP      GDGN--GIPLTSIDVAHEMTHGVTSATANLTYSGESGGLNEATSDDMMATAVEFWANNPA
SmMPI      GDGKGNKAPLTSLDVAGHEMTHGVTSATARLRYEGESGGLNEATSDFGTAVEFYARNQ
SmMPII     GDGQNNKNPLTALDVAHEMTHGVTAAATAKLVYSGESGGLNEATSDFGTAVEFYANNKT
          ***:      ***: :***.***:***:***.* *.*****: :.*****:*. *

TAMEP      DPGDYLIGEKININGDGTPLRYMDKPSKDGASKDAWYSGLGIDVHYSSGPANHWFYLAS
SmMPI      DKGDYLIGEKL-----GKPLRYMDKPSKDGSRADYWRKDLGLDLVHYSSGVANHFFYLLA
SmMPII     DVG DYLIGEKINIYGDGKPLRYMDKPSKDGSKDSWYSGIGVDVHYSSGPANHFFYLLS
          * *****:      *.***** * * * . :*:***** **:*** :

TAMEP      EGSGPKDIGGVHDSPTS DGLPVTGVGRDNAAKIWFKALTERMQSNTDYKGARDATLWAA
SmMPI      EGSGAKTINGVKYNSPTWGGIKVNGIRGAAEKLWYKALTVMYTTNTDYKGARSATLKAA
SmMPII     EGSGKKTINGVDYDPTADGSKVTGIGRDKAQKIWKALTTQFTSNTNYAKARTGTLNAA
          **** * * *.*:*** * *.*:** * *:*:*** : :*: * ** .** **

TAMEP      GELFGVNSDTYNNVANAWAAINVGPRASSGVSVTSPGDQTSIVNQAVSLQIKATGSTSGA
SmMPI      RDMFGTKSKQYKTVQAAWDGVNVK-----
SmMPII     ASLYGNNSAEYKAVAAAWSAINVK-----
          .:.* :* * : * ** .: **

TAMEP      LTYSATGLPAGLSINASTGLISGTPTTTGTSNVTVTVKDSAGKTGSTSEFKWTVNTTGGGS

TAMEP      VFENTTQVAIPDAGAAVTSPIVVTRSGNGPSALKVDVNITHYRGDLTIDLVA PNGKTWR

TAMEP      LKNSDAWD SAADVSETYTVDASSVSANGTWKLVODVYSGDSGTIDKWLTF

```

Abb. 67: Sequenzalignment von TAMEP mit den homologen *S. mobaraensis* Metalloproteasen I und II sowie dem durch Zotzel *et al.* bestimmtem N-terminalen Peptid des reifen Enzyms: Die Aminosäuresequenzen wurden aus den Nukleotiddaten übersetzt und anschließend zur Veranschaulichung durch die Online-Version der Software ClustalW2 aligniert. * = Seitenkette identisch; : = hohe Konservierung der Seitenkette; . = niedrige Konservierung der Seitenkette

```

M R P T P Q R R A V A T G A L V A V T A
GTGAGACCCA CCCCCAGAG ACGCGCCGTC GCGACCGGCG CCCTCGTTCG CGTCACCGCG

M L A V G V Q T T S A N A G Q D K A A H
ATGCTCGCCG TAGGCGTCCA GACGACCTCG GCCAACGCCG GGCAGGACAA GGCCGCGCAC

P A P R Q S I H K P D P G A E P V K L T
CCGGCCCCCC GGCAGTCGAT CCACAAGCCC GATCCGGGCG CCGAGCCGGT CAAGCTGACC

P S Q R A E L I R D A N A T K A E T A K
CCGTGCGAGC GGGCCGAGCT GATACGCGAC GCCAACGCCA CCAAGGCGGA GACGGCGAAG

N L G L G A K E K L V V K D V V K D K N
AACCTGGGCC TCGGGGCCAA GGAGAAGCTC GTCGTCAAGG ACGTCGTCAA GGACAAGAAC

G T L H T R Y E R T Y D G L P V L G G D
GGCACCTGTC ACACGCGGTA CGAGCGCACC TACGACGGCC TGGCGGTCTT CCGCGCGCAC

L V V D A T R S G Q V K T A A K A T K Q
CTGGTGGTCG ACGCCACCCG GAGCGGCCAG GTCAAGACCG CCGCGAAGGC CACCAAGCAG

R I A V A S T T P S L A A S A A E K D A
CGCATCGCGG TCGCCAGCAC GACCCCTCGT CTCGCCGCTT CCGCCGCCGA GAAGGACGCG

V K A A R A K G S K A G K A D K A P R K
GTCAAGGCCG CGCGCGCCAA GGGCTCGAAG GCCGCAAGG CCGACAAGGC GCGCGCAAG

V V W A A K G T P V L A Y E T V V G G V
GTGGTCTGGG CGGCCAAGGG CACGCCGGTG CTCGCCTACG AGACCGTCGT GGGCGGGCTC

Q D D G T P S Q L H V I T D A K T G K K
CAGGACGACG GCACGCCCAG CCAGCTGCAC GTCATCACGG ACGCGAAGAC CGGGAAGAAG

L F E F Q G V K Q G T G N S Q H S G Q V
CTCTTCGAGT TCCAGGGCGT CAAGCAGGGC ACGGGCAACA GCCAGCACAG CGGCCAGGTG

Q I G T T K S G S S Y Q M N D T T R G G
CAGATCGGCA CCACCAAGTC CGGCAGCTCG TACCAGATGA ACGACACCAC GCGCGGGCGG

H K T Y N L N H G S S G T G T L F T D S
CACAAAGACG ACAACCTGAA CCACGGTTCG TCGGGTACCG GCACCTGTT CACCGACAGC

D D V W G N G T N S D P A T A G V D A H
GACGACGTCT GGGGCAACGG GACCAACTCC GACCCGGCCA CCGCCGGTGT GGACGCGCAC

Y G A Q L T W D Y Y K N V H G R N G I R
TACGGCGCCC AGCTCACCTG GGACTACTAC AAGAACGTGC ACGGCCGCAA CGGCATCCGG

G D G V G A Y S R V H Y G N N Y V N A F
GGCGACGGCG TCGGCGCGTA CAGCCGCGTC CACTACGGCA ACAACTACGT CAACGCCTTC

W D D S C F C M T Y G D G N G I P L T S
TGGGACGACA GCTGCTTCTG CATGACGTAC GCGGACGGCA ACGGCATCCC GCTGACCTCG

I D V A A H E M T H G V T S A T A N L T
ATCGACGTCT CGGCGCACGA GATGACCCAC GGCGTCACCT CCGCCACCGC CAACCTCACC

Y S G E S G G L N E A T S D M M A T A V
TACAGCGGTG AGTCCGGCGG CCTCAACGAG GCGACCTCGG ACATGATGGC CACCGCGGTG

```

Abb. 68: Codierende Nukleotidsequenz sowie die daraus abgeleitete Primärstruktur der Transglutaminase-aktivierenden Metalloprotease TAMEP von *S. mobaraensis*

```

E F W A N N P A D P G D Y L I G E K I N
GAGTTCTGGG CCAACAACCC GGCCGACCCG GCGGACTACC TCATCGGCGA GAAGATCAAC

I N G D G T P L R Y M D K P S K D G A S
ATCAACGGCG ACGGCACCCC GCTGCGCTAC ATGGACAAGC CCAGCAAGGA CGGGGCGTCC

K D A W Y S G L G G I D V H Y S S G P A
AAGGACGCCT GGTACTCCGG CCTCGGCGGC ATCGACGTGC ACTACTCGTC CGGCCCGGCC

N H W F Y L A S E G S G P K D I G G V H
AACCCTGGT TCTACCTGGC CTCCGAGGGC AGCGGCCCCA AGGACATCGG CGGCGTGCAC

Y D S P T S D G L P V T G V G R D N A A
TACGACAGCC CGACCTCCGA CGGCCTGCCC GTCACCGGCG TCGGCCGGGA CAACGCCGCG

K I W F K A L T E R M Q S N T D Y K G A
AAGATCTGGT TCAAGGCGCT GACCGAGCGC ATGCAGTCCA ACACCGACTA CAAGGGCGCC

R D A T L W A A G E L F G V N S D T Y N
CGCGACGCCA CCCTGTGGGC GGCCGGCGAG CTGTTCTGGCG TCAACAGCGA CACGTACAAC

N V A N A W A A I N V G P R A S S G V S
AACGTGGCCA ACGCCTGGGC CGCCATCAAC GTCGGGCCCC GCGCCTCCTC CGGCGTCTCG

V T S P G D Q T S I V N Q A V S L Q I K
GTCACCAGCC CCGGCGACCA GACCAGCATC GTGAACCAGG CCGTCTCCCT GCAGATCAAG

A T G S T S G A L T Y S A T G L P A G L
GCCACCGGTT CGACGAGCGG CGCGCTGACC TACTCGGCCA CCGGCCTGCC GGCCGGCCTG

S I N A S T G L I S G T P T T T G T S N
TCGATCAACG CCTCCACCGG CTGATCTCC GGCACCCCA CCACCACGGG CACCAGCAAC

V T V T V K D S A G K T G S T S F K W T
GTGACGGTGA CGGTCAAGGA CTCCGCGGGC AAGACCGGCT CCACCTCCTT CAAGTGGACG

V N T T G G G S V F E N T T Q V A I P D
GTCAACACCA CCGGCGGCGG CAGCGTCTTC GAGAACACCA CCCAGGTGGC CATCCCGGAC

A G A A V T S P I V V T R S G N G P S A
GCGGCGCGG CCGTGACCTC GCCGATCGTC GTCACCCGGA GCGGCAACGG CCCCTCCGCG

L K V D V N I T H T Y R G D L T I D L V
CTCAAGGTGG ACGTGAACAT CACCCACACC TACCGCGGTG ACCTGACGAT CGACCTCGTC

A P N G K T W R L K N S D A W D S A A D
GCCCCGAACG GGAAGACCTG GCGGCTCAAG AACTCCGACG CCTGGGACTC CGCCGCGGAC

V S E T Y T V D A S S V S A N G T W K L
GTCTCCGAGA CGTACACCGT CGACGCCTCC TCGGTGAGCG CCAACGGCAC CTGGAAGCTC

K V Q D V Y S G D S G T I D K W R L T F
AAGGTCCAGG ACGTGTACTC GGGTGACTCC GGCACCATCG ACAAGTGGCG GCTGACCTTC

```

*
TGA

Abb. 68: Codierende Nukleotidsequenz sowie die daraus abgeleitete Primärstruktur der Transglutaminase-aktivierenden Metalloprotease TAMEP von *S. mobaraensis* (Fortsetzung)

TAMEP sowie SmMPI und II weisen nach Datenbankanalysen dieselbe Domänenstruktur auf, jedoch besitzt TAMEP als einziges der Enzyme einen ca. 200 aa langen C-terminalen Überhang. Aus diesem Grund wird nachfolgend nur der Aufbau von TAMEP untersucht. Das Ergebnis gilt aber bis auf den genannten Überhang auch für die beiden SmMP. Die Domänenanalyse erfolgte

durch Sequenzabgleich mit der NCBI-Datenbank und anschließender funktioneller Annotierung mit der *Conserved Domain Database* nach Marchler-Bauer *et al.*, 2011 (Stand: Dezember 2012).

```

      10      20      30      40      50      60      70
MRPTPQRRAV ATGALVAVTÄ MLAVGVQTTS ANAGQDKAAH PAPRQSIHKF DPGAEFVKLT PSQRAELIRD

      80      90     100     110     120     130     140
ANATKAETAK NLGLGAKEKL VVKDVVKDKN GTLHTRYERT YDGLPVLGGD LVVDATRSGQ VKTAAKATKQ

     150     160     170     180     190     200     210
RIAVASTTPS LAASAAEKDÄ VKAARAKGSK AGKADKAPRK VVWAAKGPV LAYETVVGGV QDDGTPSQLH

     220     230     240     250     260     270     280
VITDAKTGKK LFEFQGVKQG TGNSQHSGQV QIGTTKSGSS YQMNDTTRGG HKTYNLNHGS SGTGTLFTDS

     290     300     310     320     330     340     350
DDVWNGTNS DPATAGVDAH YGAQLTWDYY KNVHGRNGIR GDGVGAYSRV HYGNNYVNAF WDDSCFCMTY

     360     370     380     390     400     410     420
GDGNGIPLTS IDVAAHEMTH GVTSATANLT YSGESGGLNE ATSDMMATAV EFWANNPADF GDYLIGEKIN

     430     440     450     460     470     480     490
INGDGTPLRY MDKPSKDGAS KDAWYSGLGG IDVHYSSGPA NHWFYLASEG SGPKDIGGVH YDSPTSDGLP

     500     510     520     530     540     550     560
VTGVGRDNAA KIWFKALTER MQSNTDYKGA RDATLWAAGE LFGVNSDTYN NVANAWAAIN VGPRASSGVS

     570     580     590     600     610     620     630
VTSPGDQTSI VNQAVSLQIK ATGSTSGALT YSATGLPAGL SINASTGLIS GTPTTTGTSN VTVTVKDSAG

     640     650     660     670     680     690     700
KTGSTSFKWT VNTTGGGSVF ENTQVAIPD AGAAVTSPIV VTRSGNGPSÄ LKVDVNITHT YRGDLTIDLV

     710     720     730     740     750     760
APNGKTWRLK NSDAWDSAAD VSETYTVDAS SVSANGTWKL KVQDVYSGDS GTIDKWRLTF

```

Abb. 69: Primärstruktur der Transglutaminase-aktivierenden Metalloprotease von *S. mobaraensis* nach Zuordnung der Domänen nach Marchler-Bauer *et al.*, 2011: Dargestellt ist die Primärstruktur der TAMEP im Einbuchstabencode. Die Zuordnung der Domänen erfolgte nach funktioneller Annotierung mit der Conserved Domain Database. Blau = Fungalsin/Thermolysin-Propeptidmotiv, unterstrichen = TAMEP-N-Terminus nach Zotzel *et al.*, 2003a, rot = katalyserelavante Aminosäurereste, rot/unterstrichen = Koordinationsstellen des Zn²⁺, gelb = Positionen der katalyserelevanten Aminosäurereste homologer Proteine, grün = P-Domäne von Proprotein-Convertasen, grün/doppelt unterstrichen = RGD-Motiv

TAMEP besitzt erwartungsgemäß eine putative Erkennungssequenz für einen Transport durch die Plasmamembran über den Sec-Signalweg. Das 33 aa lange Singalpeptid besitzt drei Argininreste in der n-Region und die hypothetische Signalpeptidase-Erkennungssequenz Ala31-Asn32-Ala33 in der c-Region (SignalP 4.1 Server, <http://www.cbs.dtu.dk/>; Stand: Dezember 2012). Darauf folgend beginnt mit ca. 70 aa Abstand die typische Pro-Enzym-Struktur

mit einem Motiv, das als Fungalsin/Thermolysin-Propeptidmotiv bezeichnet wird (in Abb. 69 blau eingefärbt).

Als Mitglied der M4-Familie weist TAMEP die typische Zwei-Domänen-Struktur auf, die das Aktivzentrum im Übergang zwischen beiden definiert. Zieht man als Referenz die Kristallstruktur des sehr ähnlichen Thermolysins von *B. thermoproteolyticus rokko* heran (PDB: 4D91), so wird das für die Katalyse entscheidende Zn^{2+} von den beiden Histidinresten im hochkonservierten HEXXH-Motiv sowie einem zwanzig Aminosäuren weiter C-seitig liegenden Glutamyrest tetraedrisch komplexiert (rot markiert und unterstrichen). Die vierte Koordinationsstelle wird von Wasser besetzt (Adekoya und Sylte, 2009). Für die Katalyse sind zwei Szenarien beschrieben. Neben den drei komplexierenden Aminosäuren beteiligt sich noch ein Protonenakzeptor, entweder ein oberhalb der Komplexierungsstelle gelegener Asparaginrest mit dem Carbonylsauerstoff des benachbarten Alanins, oder zwei unterhalb der Koordinierungsstelle gelegene Asparagin- und Histidinreste (Roderick *et al.*, 1989). Die erstgenannten Aminosäuren finden sich in TAMEP (rot markiert), wohingegen sich anstelle des für die zweite Variante beschriebenen Asparaginrestes ein Glycin befindet (gelb markiert). Dies spricht gegen die zweite Variante. Neben TAMEP besitzt von den Vergleichsenzymen nur noch die Metalloprotease von *Xanthomonas axonopodis pv. citri str. 306* jenen Glycinrest (Q8PQ63; da Silva *et al.*, 2002).

C-terminal weist TAMEP eine typische P-Domäne von Proprotein-Convertasen (PC) auf (grün). Diese Enzyme sind für die Abspaltung von Propeptiden und damit für die Aktivierung eines breiten Spektrums anderer Enzyme verantwortlich (Zhou *et al.*, 1998). Die hoch konservierte P-Domäne ist essenziell für die Funktionalität der PC, entweder im Bezug auf die korrekte Faltung und damit auf die Ausbildung des Aktivzentrums und/oder auf die Erkennung der Substrat-Propeptide (Gluschankof und Fuller, 1994). Innerhalb der P-Domäne befindet sich bei den meisten PC ein hochkonserviertes RGD-Motiv, welches sowohl für die Autoprozessierung der Enzyme als auch für die korrekte Zielsteuerung entscheidend ist (Lusson *et al.*, 1997; Rovere *et al.*, 1999). Diese Motiv findet sich ebenfalls in der C-terminalen Domäne von

TAMEP (Arg692-Gly693-Asp694, doppelt grün unterstrichen). Das Vorhandensein dieser Domäne in der TAMEP sowie ihr Einwirken auf die TGase-Prozessierung lassen daher eine zusätzliche Klassifizierung in die Familie der Proprotein-Convertasen zu. Ebenso lässt sich durch die Abwesenheit dieses C-terminalen Überhangs bei den beiden SmMP sagen, dass TAMEP sich folglich funktionell stark von diesen abgrenzt, obwohl in den anderen Bereichen eine solch hohe Sequenzhomologie vorhanden ist (Abb. 67).

3.7.4. Identifizierung und Charakterisierung der hyphenhüllebildenden Chapline und Rodline

Streptomyceten bilden ihr Substratmyzel in feuchten Böden aus. Kommt es zur Erschöpfung von Nährstoffen, differenziert das Substratmyzel und es werden Lufthyphen ausgebildet, die durch die Sekretion des amphipathischen Peptids SapB die hydrophile Umgebung verlassen und in die hydrophobe Luft wachsen. Um ein Austrocknen zu verhindern, ist das hydrophile Peptidoglycan mit mehreren hydrophoben Schichten überzogen. In einer dieser Schichten, dem sog. Rodlet-Layer, wurden bereits bei mehreren *Streptomyces*-Arten Oberflächenproteine nachgewiesen, die als Chapline und Rodline bezeichnet werden. Diese bilden die für die Schicht typische Mosaikstruktur aus (Wildermuth *et al.*, 1971; Smucker und Pfister, 1978; Willey *et al.*, 1991; Chater, 2011).

Für *S. mobaraensis* ist ein solcher Aufbau bisher weder experimentell noch auf genetischer Basis beschrieben. Gleichzeitig war zum Zeitpunkt dieser Arbeit kein rodlin- oder chaplinanalogen Protein von *S. mobaraensis* beschrieben. Aus diesem Grund wurde *via* tBLASTn-Analyse ein Screening hinsichtlich solcher Gene durchgeführt, die für entsprechende homologe Proteine codieren.

3.7.4.1. Rodline

Claessen *et al.* identifizierten 2002 bei *S. coelicolor* A3(2) und *S. lividans* zwei nicht redundante Oberflächenproteine, die an der Bildung des Rodlet-

Layers beteiligt sind, und bezeichneten diese als Rodline (RdIA (Q7AY50) und RdIB (Q934F8); Claessen *et al.*, 2002). Die Beobachtung, dass *via* Southern Blot-Analyse in den Genomen von drei weiteren *Streptomyces*-Arten die betreffenden Gene nachgewiesen werden konnten, legten zwar eine Systematik nahe (Claessen *et al.*, 2002), jedoch ist am Beispiel *S. avermitilis* auch schon ein Stamm beschrieben, der keine entsprechenden Gene besitzt (Ikeda *et al.*, 2003). Aus diesem Grunde wurde im Rahmen dieser Arbeit das Genom von *S. mobaraensis* *via* tBLASTn-Analyse ebenfalls auf das Vorhandensein entsprechender Gene hin überprüft. Als Grundlage hierfür dienten die beschriebenen Primärstrukturen von RdIA und RdIB von *S. coelicolor* A3(2).

Die Analyse ergab wie bei *S. venezuelae* (Bibb *et al.*, 2012) drei Rodlin-codierende Gene (die Translationsprodukte werden im Folgenden als Rdl1, 2 und 3 bezeichnet), deren Aminosäuresequenz zwar einen hohen Grad an Homologie (64% Identität zwischen Rdl1 und Rdl2, 80% zwischen Rdl1 und Rdl3 sowie 62% zwischen Rdl2 und Rdl3), jedoch gleichzeitig deutliche Unterschiede aufweist (Abb. 70). Bei *S. mobaraensis* liegen zwei Gene in direkter Folge auf dem Plusstrang von Scaffold 01, das *rld2*-Gen 195 nt *downstream* des *rld1*-Gens. Das *rld3*-Gen hingegen ist auf dem Minusstrang von Scaffold 18 lokalisiert und befindet sich somit an einer vollkommen anderen Stelle des Genoms (Abb. 71). Claessen *et al.* identifizierten die Gene für RdIA und RdIB im Genom von *S. coelicolor* A3(2) in einem Abstand von 262 nt auf verschiedenen codierenden Strängen und die Promotorregion in jenem Zwischenraum (Claessen *et al.*, 2002), Bipp *et al.* beschrieben für *S. venezuelae* einen ähnlichen Cluster-Aufbau der drei codierenden Gene (Bibb *et al.*, 2012).

Während die putativen Transkriptionsstarts des *rld2*- und des *rld3*-Gens durch ein GTG-Codon vermittelt werden, besitzt das *rld1*-Gen ein klassisches ATG-Codon.

```

Rdl1      MDVLKKVLATTALTSTVSTVGAVSGPAMAVGHDSQDIANANGAKTGYGNTKTGGKESQMSL 60
Rdl2      M--IKKVATAALTASAVGGSVGPALADGHGSQDVTNGNQAVQMYGNTYTGGYMSQMG 58
Rdl3      M--LKKAIAATAVTASAIGAMATPAMAWAGDEQDTANANGAKTGYGNTHTGGKESQMSL 58
          *  :*: :*:*:*:*:*:*:  **:* . . ** :*: *  **** *  ****.*

Rdl1      IQGTLNKPCIGLGRANIQNIVALINIGLQDIPILSSEQEQQCTDNSSINDGDDPLSHLLD 120
Rdl2      INGSFNKPCIAIGRLNLQDVVGLVNIQLQDIPILSSEQQMQCTENSTINDGDDPLSHFLD 118
Rdl3      VQGSLNKLKIGLGRANIQNIVALLNIGLQDIPILSSEQEQQCTDNSTINDGDDPLSHILD 118
          :*:*: *  :*: *  :*:*:*:*:*:*:*:*:*: *  **:*:*:*:*:*:*:*:*:*:

Rdl1      DIPISGNGSANGRLW 136
Rdl2      NVPILSFNADHNHSH- 133
Rdl3      DLPISGNGSANG--- 131
          :*:*: *  . . *

```

Abb. 70: Sequenzalignment der drei Rodline von *S. mobaraensis*: Die Aminosäuresequenzen wurden aus den Nukleotiddaten übersetzt und anschließend zur Veranschaulichung durch die Online-Version der Software ClustalW2 aliniert. * = Seitenkette identisch; : = hohe Konservierung der Seitenkette; . = niedrige Konservierung der Seitenkette

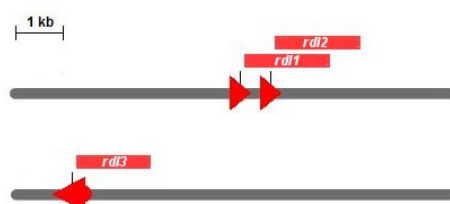


Abb. 71: Genetische Organisation der Rodlinecodierenden Gene im Genom von *S. mobaraensis*: Dargestellt ist die Anordnung der Gene (rot) zueinander auf dem Genom von *S. mobaraensis* (grau). Die unterschiedlichen grauen Bereiche stellen unabhängige Abschnitte im Genom dar. Alle Größen sind in Relation zum angegebenen Maßstab zu sehen.

Mit Längen von 136 (Rdl1), 133 (Rdl2) bzw. 131 aa (Rdl3) besitzen die drei putativen Rodline von *S. mobaraensis* eine vergleichbare Größe wie ihre Analoga, ebenso sind ihre Molmassen mit 14 009.74 (Rdl1), 13 891.50 (Rdl2) bzw. 13 345.89 Da (Rdl3) sowie pI von ca. 4.5 für alle Proteine annähernd identisch. Die beiden von Claessen *et al.* beschriebenen RdlA und RdlB von *S. coelicolor* A3(2) besitzen nach der Biosynthese eine Länge von 131 bzw. 133 aa mit einer theoretischen Molmasse von 13 083.67 bzw. 13 355.08 Da und weisen eine Identität von 61% auf (Claessen *et al.*, 2002).

Sowohl die Rodline von *S. mobaraensis* als auch von *S. coelicolor* A3(2) weisen ein 25 bis 30 aa langes putatives N-terminales Signalpeptid (inkl. Met) mit nur zwei unterschiedlichen Signalpeptidaseerkennungssequenzen auf: Ala-

Met-Ala (Rdl1, 3 und B) sowie Ala-Leu-Ala (Rdl2 und A). Die Homologien der Proteine innerhalb eines Stammes sind erwartungsgemäß bedeutend höher als stammübergreifend (Tab. 50). Besonders auffällig erscheint zudem die Identität von Rdl1 zu Rdl3, die für die beiden reifen Proteine einen Wert von annähernd 85% annimmt.

Tab. 50: Vergleich der Primärstruktur der drei Rodline Rdl1 - 3 von *S. mobaraensis* mit den zwei bekannten Rodlinien von *S. coelicolor* A3(2) (Claessen *et al.*, 2002): Dargestellt sind die Identitäten in Prozent, ermittelt in einer *in silico*-Homologiestudie der Proteine nach der Biosynthese mittels des Programms ClustalW2.

	RdlA	RdlB
Rdl1	38	41
Rdl2	35	45
Rdl3	44	39

(Die Vergleichsdaten wurden der ExPASy-Datenbank entnommen, Stand: Dezember, 2012)

Sarafeddinov *et al.* postulierten einen Einbau der drei bekannten proteinösen Proteaseinhibitoren in die äußere Lufthyphenmembran von *S. mobaraensis* durch Transglutaminase (Sarafeddinov *et al.*, 2011), es wäre somit wenig verwunderlich, wenn es sich bei den schichtbildenden Rodlinien ebenfalls um TGase-Substrate handeln würde. Daher wurde eine Analyse der reifen Proteine bezüglich potentieller Bindestellen für das Enzym vorgenommen. Hierbei zeigte sich eine hohe Anzahl von Glutaminresten, jedoch nur eine relativ geringe Anzahl an Lysinresten (Tab. 51).

Tab. 51: Vergleich der Anzahl an Lysin- und Glutaminresten in Rdl1, 2 und 3 von *S. mobaraensis* sowie RdlA und B von *S. coelicolor* A3(2) nach Abspaltung des Signalpeptids

	Lysin	Glutamin
Rdl1	4	8
Rdl2	1	9
Rdl3	3	8
RdlA	3	5
RdlB	3	7

Besonders auffällig ist bei allen drei Rodlinien das Auftreten von drei Glutaminresten im Bereich der Position 100 (Abb. 70). Hierbei könnte es sich um potentielle Bindestellen handeln. RdIA und B weisen in der analogen Position nur zwei Glutaminreste auf.

3.7.4.2. Chapline

Neben den Rodlinien ist eine weitere Proteinfamilie, die Chapline (*S. coelicolor* hydrophobic aerial proteins), an der Ausbildung des Rodlet-Layers beteiligt. Während die Rodline eher unterstützenden Charakter hinsichtlich der Architektur der Hyphenhülle besitzen, sind die Chapline zur Ausbildung der hydrophoben Außenhaut essenziell. So konnte nachgewiesen werden, dass die Deletion der Rodlingene zur Aufhebung der typischen Mosaikstruktur und zu einer fibrillären aber weiterhin funktionellen Oberfläche führte, während ein Fehlen der Chaplingene die Hülleneigenschaften dramatisch verändert und es zur Ausbildung einer hydrophilen Oberfläche kommt (Claessen *et al.*, 2004).

Die Chapline lassen sich allgemein in zwei Gruppen unterteilen: die kurzen Chapline (bei *S. coelicolor* A3(2) als ChpD - H bezeichnet) sowie die langen Chapline (ChpA - C bei *S. coelicolor* A3(2)) (Elliot *et al.*, 2003). Die kurzen Chapline besitzen bei *S. coelicolor* A3(2) im reifen Zustand eine Länge von 50-60 aa und weisen die sog. Chaplin-Domäne einmal auf. Diese Domäne besitzt 60-65% hydrophobe nicht konservierte Aminosäuren, ein konserviertes GN-Motiv lässt sich dreimal innerhalb jeder Domäne finden (Elliot *et al.*, 2003). Die reifen langen Chapline sind ca. 210-230 aa lang und besitzen die Chaplin-Domäne zweimal. Höchstwahrscheinlich kommt es über die Chaplin-Domänen zur Selbstassemblierung von langen und kurzen Chaplinen und dadurch zur Ausbildung der Hülle (Claessen *et al.*, 2003; Elliot *et al.*, 2003; Capstick *et al.*, 2007, 2011; Di Berardo *et al.*, 2008; Sawyer *et al.*, 2011). Neben diesen beiden Domänen besitzen die langen Chapline ein C-terminales Sortasebindemotiv (Elliot *et al.*, 2003), bestehend aus einem LAXTG-Pentapeptid, gefolgt von einem Bereich hoher Hydrophobizität sowie einem positiv geladenen Schwanz (Navarre und Schneewind, 1994; Mazmanian *et al.*, 1999).

Die tBLASTn-Analyse des *S. mobaraensis*-Genoms erbrachte auf Grundlage einer Chaplin-Datenbank von *S. coelicolor* A3(2) den Nachweis eines einzelnen langen sowie von fünf kurzen Chaplinen (im Folgenden als Chp1 bzw. Chp2 - 6 bezeichnet). Alle sechs Polypeptide weisen die typische Chaplinarchitektur bestehend aus N-terminalem Signalpeptid für den Sec-Signalweg, ein oder zwei Chaplin-Domänen mit jeweils drei GN-Motiven (mit einer Ausnahme, siehe unten) auf. Das lange Chp1 besitzt zusätzlich das C-terminale Sortase-Bindemotiv LAHTG (Abb. 72).

Chp1	MRQVAKKGLLTVAAGSVLAVTGGYAYA-DSG---AQGA---AHSPGVASGNTVQVPVH	53
Chp2	-MSRIAKAAALTATVGTALAGVSGTALA-DSN---AKGA---GSPGVVSGNVIQIPVH	52
Chp3	---MLKKVAATAAATGGLVLAGAGLAAA-AGG---AQGA---VNSPGVASGNVQVPVS	50
Chp4	---MKKAAAVTIAAGGLALAGAGIASA-HGG---APAAAGIAKNSPGVASGNVQVPVS	52
Chp5	-MNSAKKAALVLAAGVTVGASVGTAAHDSGATAHGIK---GSPGVISGNVIQIPLD	56
Chp6	-MSRIAKAVLMTAAAGAVAAGASGVAVA-DSN---ANGAAV---GSPGVISGNTIQVPIH	52
Chp1	VPVNVCGNTVNVVG-ALNPASGNTCVNG <u>GHGGHGS</u> <u>SHGGH</u> <u>ASHGOGHGHGGGHHGGGAGAE</u>	112
Chp2	IPINLCGNTIDIVG-LLNSTNGNVCVAD-----	79
Chp3	VPVNLCSNTVNVVG-VLNPTHGNICVNK-----	77
Chp4	IPVNLCSNTISVIG-SMNPTHGNVCVNE-----	79
Chp5	VPINACGNTVDILLGILNPTFGNVCVVK-----	84
Chp6	VPINLCGNSIDI IA-LLNPTFGNTCVAD-----	79
Chp1	<u>GAAVGSPGIASGNVQAPVDVPVNACGNTVDVAAVANPTFGNACINGGH</u> <u>HDHGRGPDHTRP</u>	172
Chp1	<u>HHPGEPSSHHPADKPHGDHGT</u> <u>HEDHGT</u> <u>HGDKDKPCDEHRPAGHHNPPAEHSAHKPGHVT</u>	232
Chp1	<u>PGPLASGP</u> <u>IVPVAVVKDAHRPAQQA</u> <u>AVEEKDDQLAHTGAGELGMAGAASAALLGGAVLY</u>	292
Chp1	<u>RRSRAGQQG</u>	301

Abb. 72: Sequenzalignment der sechs Chapline von *S. mobaraensis* sowie Zuordnung der Domänen nach Elliot et al., 2003: Die Aminosäuresequenzen wurden aus den Nukleotiddaten übersetzt und anschließend zur Veranschaulichung durch die Online-Version der Software ClustalW2 aligniert. Rot = Chaplin-Domänen, Gelb = Sortase-Bindemotiv, Grün = hydrophobes Linkerpeptid, Blau = positiv geladener Schwanz, einfach unterstrichen = Histidin-Prolin-reiche Domäne, doppelt unterstrichen = Histidin-Glycin-reiche Domäne

Charakteristisch für alle Chapline ist das Auftreten von zwei Cysteinresten innerhalb einer jeden Chaplindomäne. Elliot et al. beschrieben einen hohen Anteil an β -Faltblattstrukturen innerhalb dieser Domänen, die von den GN-Motiven durch eine Schleife voneinander getrennt sind (Elliot et al., 2003). Durch Ausbildung intramolekularer Cystinbrücken kommt es zur Stabilisierung der charakteristischen Chaplin-Oberflächenstrukturen. Die beschriebenen Cysteinreste finden sich in jedem der sechs Polypeptide. Chp3 weist an Position 58 und 59 statt des GN- ein SN-Motiv auf. Wegen der Ähnlichkeit der

beiden Aminosäuren Glycin und Serin sollte es jedoch hier nicht zu einer starken Konformationsänderung kommen.

Die putativen Längen der kurzen Chapline von *S. mobaraensis* stimmen nach der Sekretion gut mit denen von *S. coelicolor* A3(2) überein, das lange Chp1 jedoch ist um ca. 40-60 aa länger als ChpA bis C (Tab. 52).

Tab. 52: Längen, Molmassen und pI der sechs Chapline von *S. mobaraensis*: Die Aminosäuresequenzen wurden aus den Nukleotiddaten abgelesen, die Molmassen- sowie die pI-Bestimmung erfolgte mittels ExPASy-Peptide-Mass Calculator, Stand: Dezember 2012. Dargestellt sind die Daten der Proteine nach der Biosynthese sowie in Klammern nach dem Transfer durch die Plasmamembran

	Länge / aa	Molmasse / Da	pI
Chp1	301 (273)	29473.15 (26723.88)	6.60 (6.39)
Chp2	79 (60)	7554.68 (5755.51)	6.50 (4.41)
Chp3	77 (52)	7160.30 (4980.65)	9.31 (8.81)
Chp4	79 (55)	7344.47 (5277.98)	8.84 (6.90)
Chp5	84 (57)	8076.34 (5693.53)	6.69 (5.20)
Chp6	79 (52)	7543.67 (5145.79)	5.28 (3.93)

Die chaplincodierenden Gene bei *S. mobaraensis* befinden sich über das gesamte Genom von *S. mobaraensis* verteilt (Abb. 73). Elliot *et al.* beschrieben für die Gene von *S. coelicolor* A3(2) eine gewisse Systematik. So fällt hier besonders die genetische Organisation von *chpA*, *chpD* sowie der rodlincodierenden Gene *rdIA* und *rdIB* auf, die in einem Cluster angeordnet sind. Nur *rdIB* liegt hierbei auf dem Plusstrang, die anderen drei Gene reihen sich in direkter Abfolge auf dem Minusstrang (Elliot *et al.*, 2003). Eine solche genetische Organisation gibt es bei *S. mobaraensis* nicht. Hier sind zwar die Gene *chp1* und *chp3* im Abstand von 158 nt auf dem Plusstrang von Scaffold 03 sowie *chp4* und *chp5* im Abstand von 198 nt auf dem Plusstrang von Scaffold 08 jeweils aufeinander abfolgend in einem Cluster angeordnet, die rodlincodierenden Gene befinden sich jedoch in einem vollkommen anderen DNA-Bereich (Abb. 71). Ebenso sind die restlichen beiden Chaplingene an anderen Stellen lokalisiert. Das *chp2*-Gen befindet sich auf dem Plusstrang von

Scaffold 02 und das *chp6*-Gen auf dem Plusstrang von Scaffold 17. Alle Gene besitzen mutmaßlich ein klassisches ATG-Codon als Transkriptionsstart.

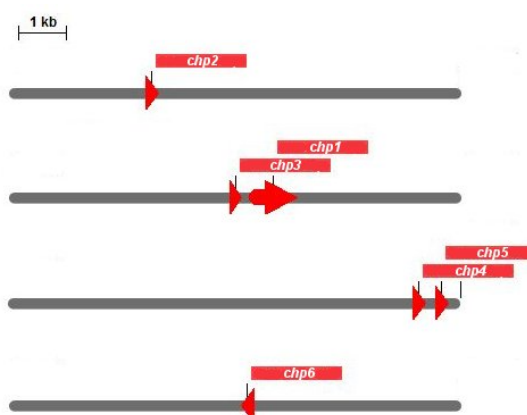


Abb. 73: Genetische Organisation der chaplincodierenden Gene im Genom von *S. mobaraensis*: Dargestellt ist die Anordnung der Gene (rot) zueinander auf dem Genom von *S. mobaraensis* (grau). Die unterschiedlichen grauen Bereiche stellen unabhängige Abschnitte im Genom dar. Alle Größen sind in Relation zum angegebenen Maßstab zu sehen.

Tab. 53: Vergleich der Primärstruktur des langen Chaplins Chp1 von *S. mobaraensis* mit den drei bekannten langen Chaplinen ChpA, B und C von *S. coelicolor* A3(2) (Elliot *et al.*, 2003): Dargestellt sind die Identitäten in Prozent, ermittelt in einer *in silico*-Homologiestudie der Proteine nach der Biosynthese mittels des Programms ClustalW2.

	ChpA	ChpB	ChpC
Chp1	44	46	49

Tab. 54: Vergleich der Primärstruktur der fünf kurzen Chapline Chp2 - 6 von *S. mobaraensis* mit den fünf bekannten kurzen Chaplinen ChpD - H von *S. coelicolor* A3(2) (Elliot *et al.*, 2003): Dargestellt sind die Identitäten in Prozent, ermittelt in einer *in silico*-Homologiestudie der Proteine nach der Biosynthese mittels des Programms ClustalW2.

	ChpD	ChpE	ChpF	ChpG	ChpH
Chp2	50	44	59	62	53
Chp3	56	59	61	53	75
Chp4	44	60	58	55	64
Chp5	48	52	41	35	45
Chp6	54	49	62	60	55

(Die Vergleichsdaten wurden der ExPASy-Datenbank entnommen, Stand: Dezember, 2012)

3.7.5. Signalpeptidasen

Die Aktivität von Transglutaminase unterliegt durch verschiedene Prozessierungsschritte einer starken Kontrolle. Nach der Biosynthese am Ribosom erfolgt der Transport des Proteins durch die Cytoplasmamembran. Die Abspaltung des Signalpeptids erfolgt hierbei durch bisher unbekannte Signalpeptidasen (Sip). Da ebenfalls alle anderen Proteine, die im Rahmen der Transglutaminaseforschung entdeckt wurden, wie auch die hyphenhüllebildenden Rodline und Chapline, Signalpeptide besitzen, die nach dem Transport entfernt werden müssen, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Gene identifiziert, die für entsprechende Signalpeptidasen von *S. mobaraensis* codieren.

In den Datenbanken ist eine Vielzahl Sip-codierender Gene vorhanden. Als Grundlage für die tBLASTn-Analyse in dieser Arbeit dienten vier Klasse 1-Sip (K1VVC9, K1V387, F2R5H6, F2R5H5) und vier Klasse 2-Sip (Q9S2X7, J2JRI9, F3ZJ98, D9X255), die sog. Lipoproteinsignalpeptidasen, verschiedener Streptomyceten. Zusätzlich wurden noch die fünf chromosomalen SipS, T, U, V und W (P28628, P71013, P42959, O07560, P54506) und eine der beiden bekannten plasmidischen SipP (P37943), alles Mitglieder der Klasse 1-Sip, sowie eine Klasse 2-Sip (Q45479) des im selben Habitat wie *Streptomyces* vorkommenden *B. subtilis* in die Datenbank hinzugefügt.

Auf diese Weise ließen sich im Genom von *S. mobaraensis* insgesamt fünf putative Signalpeptidasen der Klasse 1 (im Folgenden als Sip1 - 5 bezeichnet) sowie ein Enzym der Klasse 2 (Lsp1) identifizieren, von denen das *sip2*- und das *sip5*-Gen ein alternatives putatives GTG-Startcodon aufweisen. Das *sip5*-Gen ist auf dem Plusstrang von Scaffold 04 zu finden. Interessanterweise befinden sich die codierenden Gene *sip1*, 2, 3 und 4 allesamt auf dem Minusstrang von Scaffold 01 in einem putativen Cluster angeordnet (Abb. 74) (ein Bereich von ca. 500 nt zwischen den Genen *sip3* und 4 war zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht sequenzierbar, daher ist die codierende Nukleotid- und damit auch die Aminosäuresequenz von Sip4 am 3'- bzw. C-terminalen Ende unvollständig; in Abb. 74 grün markiert). Dieselbe genetische Organisation

wurde bereits bei *S. lividans* (Parro *et al.*, 1999), *S. coelicolor* A3(2) (Bentley *et al.*, 2002) sowie *S. venezuelae* festgestellt (Pullan *et al.*, 2011), wohingegen die enzymcodierenden Gene von *B. subtilis* über das gesamte Genom verteilt vorliegen (Kunst *et al.*, 1997). Zwischen den Genen *sip1* und 2 bzw. 2 und 3 befindet sich ein putativer nicht-codierender Bereich von 208 bzw. 179 nt Länge. Der nicht-codierende Bereich zwischen *sip3* und 4 war wegen der unvollständigen Nukleotidsequenz nicht analysierbar.

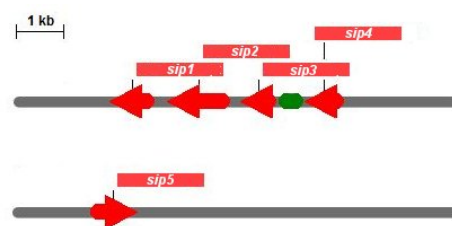


Abb. 74: Genetische Organisation der signalpeptidasecodierenden Gene im Genom von *S. mobaraensis*: Dargestellt ist die Anordnung der Gene (rot) zueinander auf dem Genom von *S. mobaraensis* (grau). Die unterschiedlichen grauen Bereiche stellen unabhängige Abschnitte im Genom dar. In grün dargestellt ist ein Bereich, der während der Sequenzierung nicht erfasst wurde. Alle Größen sind in Relation zum angegebenen Maßstab zu sehen.

Die fünf Signalpeptidasen von *S. mobaraensis* unterscheiden sich in Länge, Molmasse und pI vollständig voneinander (Tab. 55). Mit 204-361 aa sind sie entweder so lang wie Sip's vom ebenfalls Gram-positiven *B. subtilis* (z.B. SipS: 184 aa) oder wie die größeren Klasse 1-SIP LepB des Gram-negativen *E. coli* (323 aa). Durch die unterschiedliche Länge der Sip1 bis 5 kommt es auch zu einer unterschiedlichen Integration des Proteins in der Zellmembran, wobei teilweise eine zusätzliche C-terminale Transmembrandomäne vorhanden ist (siehe unten).

Alle fünf Sip von *S. mobaraensis* weisen die von van Dijl *et al.* beschriebene Architektur auf (Abb. 76) (van Dijl *et al.*, 1992, 1995). SipS von *B. subtilis* ist in vielen Bereichen stark homolog zu LepB von *E. coli*, welche neben anderen Mitgliedern der Enzymfamilie der Autoprozessierung unterliegt (Little, 1993; van Dijl *et al.*, 1992, 1995). Da Sip1 bis 5 ebenfalls starke Homologien zu SipS und LepB von *B. subtilis* bzw. *E. coli* aufweisen, kann gemutmaßt werden, dass diese ebenfalls einen Selbstaktivierungsmechanismus besitzen. Diese

Vermutung wird dadurch erhärtet, dass mittels SignalP 4.1 Server bei keinem der fünf Enzyme ein klassisches Signalpeptid bestimmt werden konnte (<http://www.cbs.dtu.dk/>; Stand: Dezember 2012; Petersen *et al.*, 2011).

Tab. 55: Längen, Molmassen und pI der fünf Signalpeptidasen von *S. mobaraensis*: Die Aminosäuresequenzen wurden aus den Nukleotiddaten übersetzt, die Molmassen- sowie die pI-Bestimmung erfolgte mittels ExPASy-Peptide-Mass Calculator, Stand: Dezember 2012. Angegeben sind die Daten der Proteine nach der Biosynthese.

	Länge / aa	Molmasse / Da	pI
Sip1	263	26 492.32	10.29
Sip2	361	37 588.54	6.28
Sip3	204	21 964.48	8.71
Sip4*	230	24 810.48	9.44
Sip5	300	32 357.15	8.50

* = Unvollständige Aminosäuresequenz

Nach der von van Dijl *et al.* beschriebenen Architektur besitzen Signalpeptidasen fünf hoch-konservierte Bereiche, die im Folgenden als Box A bis E bezeichnet werden. Hierbei befindet sich in Box A die für LepB beschriebene Transmembranregion (Dalbey *et al.*, 1987). Der C-terminale Rest ragt in der Folge aus der äußeren Plasmamembran heraus. In den Boxen B, D und E sind die Aminosäuren lokalisiert, die für die Aktivität des Enzyms hinsichtlich der Struktur oder der katalytischen Diade entscheidend sind. Die Bedeutung von Box C für die Struktur oder Funktionalität des Enzyms ist nicht vollständig geklärt (van Dijl *et al.*, 1995). Parro *et al.* beschrieben für SipX, SipY und SipZ von *S. lividans* das Vorhandensein einer zusätzlichen C-terminalen Transmembranregion (1999), wie sie häufig bei Gram-negativen Organismen (van Dijl *et al.*, 1992) aber auch beim Gram-positiven *Rhodococcus capsulatus* oder *B. subtilis* (SipW) vorkommt (Klug *et al.*, 1997; Tjalsma *et al.*, 1998). Mittels des Transmembrane prediction using Hidden Markov Models-Servers (TMHMM) ließen sich für vier Klasse 1-Sip (außer Sip4) ebenfalls die putativen Transmembrandomänen vorhersagen (Abb. 75) (<http://www.cbs.dtu.dk/>; Stand: Dezember 2012). Hierbei bestätigten sich die in Abb. 76 rot markierten

N-terminalen Regionen (Box A). Zusätzlich konnten für Sip1 (Leu206 - Ala228), Sip 2 (Ala268 - Leu 287) sowie Sip 5 (Leu321 - Trp343) in drei Enzymen C-terminale putative Membrananker bestimmt werden (in Abb. 76 doppelt unterstrichen). Dieser zweite Anker hat jedoch keinen Einfluss auf die Lokalisation der essentiellen Domänen (Tjalsma *et al.*, 1998), unterstreicht jedoch abermals die Unterschiede zwischen den einzelnen Signalpeptidasen innerhalb eines Organismus. Bis dato konnte noch für keinen Organismus eine Substratspezifität der einzelnen Peptidasen eindeutig bestimmt werden. Vorhersagen über die Spezifität einer Sip oder ihre Beteiligung an der Prozessierung der in dieser Arbeit untersuchten Proteine waren entsprechend nicht möglich.

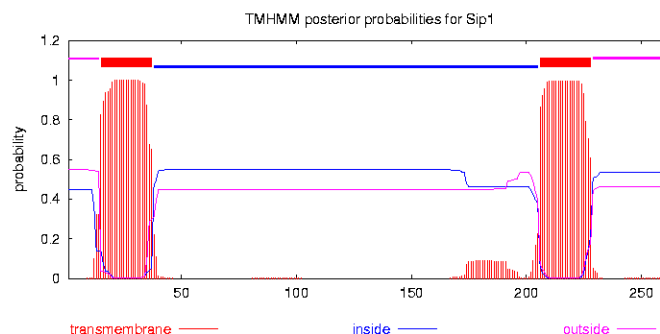


Abb. 75: Simulation der potentiellen Transmembranregionen für Signalpeptidasen am Beispiel von Sip1 mittels TMHMM-Server (<http://www.cbs.dtu.dk/>; Stand: Dezember 2012): Angegeben sind die Wahrscheinlichkeiten für die Lokalisation des Aminosäurebereichs auf der Innenseite (blau), der Außenseite (rosa) oder in der Membran (rot). Da bekannt ist, dass der N-terminale Bereich der kurzen Sip ins Cytoplasma ragt, bedeutet dies, dass als Innenseite der Membran folglich die cytosolische Seite definiert ist.

Sip2	MGDVAVGARSGHGEPEKRPD GAGDPAAGQRVPPSPSPVPPSPSSSPGSQGPHEGPGGPPPP	60
Sip4	-----MDTDAQLSERDRSPHPE-----GGEEQR	23
Sip5	MGDVAVGARSEQGGPEEEFVGA-----AGGTETP-	28
SipX	-----MGSRGKPRGAPSSPAEN-----LLPTGSRR	26
Sip1	-----MGAERGGPGRAGRLVSGIAVALGAVLFLGG	31
Sip2	EDLGRTPEGPGGDLPEGQEPGGSVPSSKGGKPGKSGKSGKQRSFWKELPILIGVALILA	120
Sip3	-----MPVLLSVALLIA	12
Sip4	-----SRSSRIPGRSGLAGLPRAWRLTGGGPLRRAGVLLACCLALV	66
Sip5	-----AGKAEQAETGKAKK--KAGQQRPFWKELPLLGVVALVLA	66
SipX	-----AAPSGGRSRAERRKLQRKVRRRRRGAVKEIPLLGVAVLIA	68
SipS	-----MKSENVSKKKSI LEWAKAIVIAVLA	26
Sip1	FAWAALVYKPYTVPD SM APT ^I ARGARVLAQRID---GDDVRRGDVVVFHD-----	79
Sip2	LFIKTFLVQAFSIPSE SM QDTLQRGDRVLVDKLT ^{PWF} GAE ^{PER} GEV ^{VVF} HD ^{PG} SWLRDTP	180
Sip3	LLLKTFLVQAFVIPSG ^{SME} QTI ^{RV} GDRVLVDKLT ^{PWF} GDR ^{PG} RDV ^{VVF} DK ^{PD} GDWL-GEA	71
Sip4	MLVGAYVQPFVIP ^{SAS} MENTLRPGDRVLVNKLAYRFGD ^{PR} GDV ^{IVF} DGLGSFVQEEP	126
Sip5	LLIKTFLVQAFSIPSD SM QDTLQRGDRVLVDKLT ^{PWF} GSE ^{PER} GEV ^{IVF} HD ^{PG} TWLRDEP	126
SipX	LVLKTFLVQAFVIPSG ^{SME} QTI ^{RI} GDRVLVDKLT ^{PWF} GSE ^{PR} GDV ^{VVF} RD ^{PG} WLQGEQ	128
SipS	LLIRNFIFAPYVVDG SM YPTLHNRERFVNMTVKYIGE ^{FD} R-GDIVVLNG-----	76
Sip1	-----KVWGD ^{MAMV} <u>KRV</u> VGVGGDTVACCDRRGRMTVNGTPVE	116
Sip2	GEQS--GPVGNVQKVL ^{SF} VGLMPSAGEKD ^{LI} <u>KRV</u> IAVGGDKVECKGNNPVVNGKALD	238
Sip3	GVPAEGSAGIRAGRRVLSF ^{IG} LLPSAGEQD ^{LI} <u>KRV</u> AVGGDRVKCCDASGKIMVNGSPVR	131
Sip4	AEN---AVTKAVRKVASVGLMQPAP-TDYV <u>KRV</u> VGVGGDRVVC ^{DH} -RGR ^{LS} VNGRVIT	180
Sip5	-----TPEPNMVQKALSFI ^{GL} MPSANEKD ^{LI} <u>KRV</u> IGVAGDTVECKG-TG ^{PL} KVNGKPLQ	179
SipX	TTKKDDPVVVKQVKEGLAFI ^{GL} PSDDEKD ^{LI} <u>KRV</u> VGVGGDHVKCCDKQGRVTVNGVPLT	188
SipS	-----DDVHYV <u>KRI</u> IGLPGDTVEMKN--DQLYINGKKVD	108
Sip1	EPYLHGGGPASSDFSAT-----VPKGELFLLGDH ^{RAD} SVDSRFHLGK-DQGAIPR	165
Sip2	EPYIFPGDTPCSDKPF ^G -----PVTVPKGKLWVMGDH ^{RQ} NSMDSRW ^{HQ} DE ^{DG} -GFVPV	290
Sip3	EPYVHPGNPP-SELIFD-----VRVPRGR ^{LF} VLGDH ^{RS} DSAD ^{SF} HLAD ^{PG} HGTVPE	182
Sip4	EDYLFPGDTA-SRV ^{PF} T-----VVVEGR ^{LF} VLGDH ^{RS} ASR ^{DS} RDHLGEPGGGMVX-	230
Sip5	EPYVFPGNTPCSLAPEGQF-----KVTVPKDR ^{LW} VMGDH ^{RQ} NSAD ^{SF} HQDE ^{PG} NGFVPV	234
SipX	EDYLYPGDRP-SRTP ^{FD} -----VTVEGR ^{LW} VMGDH ^{RS} NSAD ^S RAHQET-DFGTVSQ	238
SipS	EPYLAANKKRAKQDGF ^{DH} LTD ^{DF} GPVKVPD ^{NKY} FVMGD ^{NR} NSMDSR-----NGLGLFTK	163
Sip1	DAVSARVDAVLWPAGDLGVLSRPAAFGALPGGTSRPGPVRL ^{LAVAVVAGAA} LI ^{LGGAAYG}	225
Sip2	DDVVGRAIVVAWPLNRWATLPVPD ^T FDQ ^{PGLG} AAAAAAPPALGLAG-----AVP	339
Sip3	DLVIGRAMVVAWPPGHWRPLSR-----	204
Sip5	GNVVGRAIVVAWPIDRWATLPVPD ^T FDQ ^K GIDKAAATAPTAVAFVG-----AVP	283
SipX	DEVVGRAMVIAWPF ^{GH} WTTLD ^{EP} KTYASVSDAASGSTAAP ^{EL} SHRVAPYDPNAMMELPTP	298
SipS	KQIAGTSKFVFPFNEMRKTN-----	184
Sip1	<u>PLARLL</u> TRRRASGGPASGGPASGGKASGGTGRAVAPRG	263
Sip2	<u>LVL</u> RRRRLLATRAAASAVRD-----	361
Sip5	<u>LVL</u> RRRVAVRRAERRG-----	300
SipX	AELPLVMGVVACAVSGAGGGRE-----	320

Abb. 76: Sequenzalignment der fünf Klasse 1-Signalpeptidasen von *S. mobaraensis* mit SipX von *S. lividans* (O86869) und SipS von *B. subtilis* (P28628) sowie Zuordnung der Domänen nach van Dijk et al., 1992, 1995: Die Aminosäuresequenzen wurden aus den Nukleotiddaten übersetzt und anschließend zur Veranschaulichung durch die Online-Version der Software ClustalW2 aligniert. Rot = Box A, Grün = Box B, Blau = Box C, Gelb = Box D, Rosa = Box E. Die für die Aktivität wichtigen Aminosäuren sind unterstrichen. Die Aminosäuren der katalytischen Diade sind unterstrichen und kursiv. Die C-terminale Membranankerdomäne ist, soweit vorhanden, doppelt unterstrichen.

Die BLAST-Analyse der Primärstruktur des Papaininhibitors SPI erbrachte Homologien zu putativen Lipoproteinen (Tab. 45). Aus diesem Grund ist an

dieser Stelle auch die sechste Signalpeptidase, die im Genom von *S. mobaraensis* gefunden wurde, jedoch als einzige zur Familie der Klasse 2-Sip (oder auch Prolipoprotein-Sip) gehört, von Interesse. Prolipoproteinsignalpeptidasen erkennen ein hochkonserviertes Leu-(Ala,Ser,Thr)-(Gly,Ala)-(S-Diacylglyceryl)-Cys-Motiv und hydrolysieren die N-seitige Peptidbindung des Cysteins (Inouye *et al.*, 1983a, 1983b; Paetzel *et al.*, 2002). Da SPI dieses charakteristische Motiv jedoch nicht aufweist, ist es unwahrscheinlich, dass das Signalpeptid des Inhibitors tatsächlich auch von einer Klasse 2-Sip entfernt wird.

Das mutmaßliche *lsp1*-Gen von *S. mobaraensis* liegt auf dem Plusstrang von Scaffold 04 und weist in der Peripherie nur Gene auf, die für putative Proteine codieren. Mit einer mutmaßlichen Länge von 138 aa und einer Molmasse von 14 771.34 Da ist das Enzym um ca. 11% kleiner und rund 18% leichter als LspA von *B. subtilis* (Q45479; 154 aa, 17 426.81 Da). Klasse 2-Sip weisen wie die Enzyme der Klasse 1 eine konservierte Architektur bestehend aus fünf konservierten Domänen auf. Im Gegensatz zu den Sip besitzen Lsp jedoch vier Transmembrandomänen (Paetzel *et al.*, 2002). Interessanterweise fehlt bei Lsp1 die erste dieser vier Domänen vollständig (rot in Abb. 77).

Lsp1 <i>S. mobaraensis</i>	-----	
LspA <i>S. coelicolor</i>	MAEAERIIGTPDIPDAAGEGQERPDADPEREQEQEQAPERTRGKRRVAVLFAVALFAYL	60
LspA <i>B. subtilis</i>	-----MLYYMIALLIIA	12
Lsp1 <i>S. mobaraensis</i>	-----MLVVAKLEHHDPIEVFGTWLQLDVIRNRGAASFSLGETMTIVFTIIASAVILVIA	54
LspA <i>S. coelicolor</i>	LDLGSKMLLVAKLEHHEPIEIIIGDWLRFAAIRNAGAAFGEAEFTIIFTVIAAAVIVVIA	120
LspA <i>B. subtilis</i>	ADQLTKWLTVKNMELGQSIPIIDQVFYITSHRNTGAAGWILAGQMWFYLLITTAIVIGIV	72
Lsp1 <i>S. mobaraensis</i>	RIARKLYS--LPWAIALGLLLGGALGNLTDRLFSPGGFEGGVVDFIAPAHFAV----	FN 108
LspA <i>S. coelicolor</i>	RLARKLHS--LPWAIALGLLLGGALGNLTDRIFRAPGVFEGAVVDFIAPKHFAV----	FN 174
LspA <i>B. subtilis</i>	YYIQRYTKGQRLLGVALGLMLGGAIGNFIDRAVR--QE----VVDFIHVIIVNYPYIFN	126
Lsp1 <i>S. mobaraensis</i>	LADSAIVCGGFLIVILSFRGLDPDGTVHQD-	138
LspA <i>S. coelicolor</i>	LADSAIVCGGILIVILSFRGLDPDGTVHKD-	204
LspA <i>B. subtilis</i>	IADSSLCVG---VMLLFIQMLLDGSKKKKEQ	154

Abb. 77: Sequenzalignment von Lsp1 von *S. mobaraensis* mit den LspA von *S. coelicolor* A3(2) (Q9S2X7) und *B. subtilis* (Q45479) sowie Zuordnung der Domänen nach Paetzel *et al.*, 2002: Die Aminosäuresequenzen wurden aus den Nukleotiddaten übersetzt und anschließend zur Veranschaulichung durch die Online Version der Software ClustalW2 aligniert. Rot = Box A, Grün = Box B, Blau = Box C, Gelb = Box D, Rosa = Box E. Die für die Aktivität wichtigen Aminosäuren sind unterstrichen, der für die Stabilität wichtige Asp-Rest in den beiden LspA ist doppelt unterstrichen (Tjalsma *et al.*, 1999).

4. Diskussion

Im Zusammenhang mit der Transglutaminaseforschung der AG Fuchsbauer konnten drei proteinöse Transglutaminasesubstrate in der Submerskultur von *S. mobaraensis* identifiziert werden, die alle gleichzeitig als Antagonisten gegen Proteasen von koexistierenden Organismen wirken, das sind der *Streptomyces*-Subtilisin- und TAMEP-Inhibitor SSTI (Schmidt *et al.*, 2008), das Dispaseautolyse-induzierende Protein DAIP (Sarafeddinov *et al.*, 2009) und der *Streptomyces*-Papaininhibitor SPI (Sarafeddinov *et al.*, 2011). Von diesen Proteinen war zu Beginn dieser Arbeit nur die Sequenz der N-terminalen Peptide bekannt. Ziel dieser Arbeit war es, die codierenden Gene zu entschlüsseln und die Proteine weitergehend zu charakterisieren.

4.1. Der *Streptomyces*-Subtilisin- und TAMEP-Inhibitor

Der *Streptomyces*-Subtilisin- und TAMEP-Inhibitor (SSTI) ist ein homodimeres Protein und konnte aufgrund seines N-terminalen Peptids der weit verbreiteten Familie der *Streptomyces*-Subtilisininhibitoren SSI zugeordnet werden (Abb. 62, Tab. 48). Trotz starker Sequenzhomologien innerhalb dieser Gruppe gelang es in dieser Arbeit nicht, das codierende Gen von SSTI über molekularbiologische Methoden wie Southern Blot-Analyse aufzuklären, da keiner der verwendeten PCR-Primer zu einem distinkten DNA-Fragment mit korrekter Sequenz führte. Die Bestimmung der Aminosäuresequenz konnte erst später durch vollständige Genomsequenzierung und anschließender Genannotation erreicht werden.

Hierbei stellte sich heraus, dass das Protein, das, abgeleitet vom N-terminalen Aufbau, mutmaßlich über den Sec-Signalweg durch die Plasmamembran transportiert wird, zwei potentielle Erkennungssequenzen für Signalpeptidasen besitzt (Ala26-Ser27-Ala28 sowie Ala31-Pro32-Ala33; Abb. 60). Berechnungen über den SignalP 4.1 Server (Abb. 61; Petersen *et al.*, 2011) ergaben ähnlich hohe Wahrscheinlichkeiten für beide Stellen. SSTI

besitzt jedoch an Position 34 einen Prolinrest, und Untersuchungen konnten zeigen, dass eine entsprechende Aminosäure in P1-Position die proteolytische Spaltung inhibiert (Barkocy-Gallagher und Bassford, 1992; Nilsson und von Heijne, 1992). Daher kommt nur das erstgenannte Tripeptid als Erkennungssequenz in Frage. Schmidt *et al.* konnten zeigen, dass SSTI von einer Prolyl-Tri-/Tetraaminopeptidase (PTP-SM) N-terminal prozessiert wird, wodurch dessen Inhibitoraktivität sinkt (Schmidt *et al.*, 2008). PTP-SM ist am letzten Schritt der Transglutaminaseprozessierung beteiligt und besitzt als Erkennungssequenz ein konserviertes Ala-Pro-Motiv (Abb. 5; Zotzel *et al.*, 2003b). Reifer SSTI besitzt nach Abspaltung des Signalpeptids N-terminal ein TPAPAP-Hexapeptid und weist damit an dieser Stelle das besagte Ala-Pro-Motiv gleich zweimal auf. Dies würde somit den von Schmidt *et al.* beobachteten Effekt erklären.

Monomerer SSTI besitzt nach dem Transport durch die Plasmamembran eine theoretische Molmasse von 12 596.26 Da, welche durch N-terminale Hydrolyse des TPAPAP-Hexapeptids bis auf 12 061.65 Da sinkt. Schmidt *et al.* bestimmten experimentell eine apparente Molmasse von ca. 14 kDa (Schmidt *et al.*, 2008). Theoretische und apparente Molmasse unterscheiden sich somit um ca. 10%. Wodurch dieser Massenunterschied hervorgerufen wird, oder ob das Protein im Polyacrylamidgel lediglich ein ungewöhnliches Laufverhalten zeigt, konnte mit dieser Arbeit nicht geklärt werden. Ebenfalls konnte auf der Grundlage der Primärstruktur keine Aussage darüber getroffen werden, wodurch die beobachtete Abnahme der Inhibitoraktivität nach N-terminaler Hydrolyse verursacht wird.

Vergleiche der SSTI-Primärstruktur mit Proteinen aus der NCBI-Datenbank zeigten die erwarteten Homologien zu anderen Mitgliedern der Familie der *Streptomyces*-Subtilisininhibitoren (SSI). So zeigten die fünf Proteine, die SSTI am ähnlichsten zu sein schienen, eine Sequenzidentität auf Aminosäureebene von meistens über 70%. Alle diese Proteine werden von Mitgliedern der Gattung *Streptomyces* produziert (Tab. 48). Dies belegt, dass Vertreter der SSI-Familie innerhalb der Gattung weit verbreitet sind. Neben SSTI zeigt der *Streptomyces caespitosus* neutral protease inhibitor (ScNPI) als einziger

Vertreter neben der Aktivität gegen Subtilisin auch eine Aktivität gegen Metalloproteasen (Hiraga *et al.*, 2000). Es scheint aufgrund der hohen Identität der Proteine innerhalb dieser Familie jedoch auch denkbar, dass alle anderen Mitglieder ebenfalls eine solche Doppelfunktion aufweisen (Chater, 2011).

Neben Proteinanaloga innerhalb der Gattung *Streptomyces* zeigt SSTI auch Homologien zu weiteren Proteinen, die von verschiedenen Actinomyceten, zu denen auch die Streptomyceten gehören, produziert werden. Hierbei weisen die fünf Proteine, die SSTI am ähnlichsten sind, immerhin noch eine Aminosäurenidentität von 35-45% auf, jedoch war keines dieser Proteine zum Zeitpunkt dieser Arbeit funktionell charakterisiert (Tab. 49). Dieses Ergebnis deutet erneut auf einen weit verbreiteten Wirkmechanismus hin, der sich bereits zu einem frühen evolutionären Zeitpunkt entwickelt haben muss. Hier wäre somit ein neuer Forschungsansatz gegeben.

Reifer SSTI besitzt acht Lysin- und sechs Glutaminreste, die potenziell für die Vernetzung mit Transglutaminase zur Verfügung stehen. Schmidt *et al.* bestimmten einen experimentellen pI von ca. 9.0. Demgegenüber steht ein theoretischer Wert von 8.4, der aus der Primärstruktur berechnet wurde. Gleichfalls konnten Schmidt *et al.* zeigen, dass Transglutaminase ihre Substrate unter bestimmten Bedingungen modifiziert. Steht nach der Ausbildung des Acyl-Enzym-Komplexes kein Amindonor zur Verfügung, ist Wasser das Kosubstrat, wodurch Glutamat entsteht und das Protein seine Glutamindonoreigenschaften verliert (Nemes *et al.*, 2005; Schmidt *et al.*, 2008). Ein sukzessiver *in silico*-Austausch der Glutamin- durch Glutamatseitenketten senkte jedoch den theoretischen pI bis auf einen Wert von 5.2. Somit ließen sich die Differenz zwischen theoretischem und experimentell ermitteltem Wert auf diese Weise nicht erklären. Auch war keine Aussage über solche Aminosäurereste möglich, die für eine Reaktion mit TGase zur Verfügung stehen könnten.

Auf Grundlage der ermittelten Primärstruktur des SSTI konnte jedoch ein *in silico*-Modell des Proteins durch Abgleich von berechneten Sekundärstrukturen erstellt werden (Abb. 63; Kelley und Sternberg, 2009). Hierbei fiel die räumliche Nähe einiger Glutaminreste zueinander bzw. zu Asparaginresten auf. Jeweils

zwei Carboxamidgruppen oder eine Carboxamidgruppe und eine Peptidbindung des Proteinrückgrats können unter Ausbildung von Wasserstoffbrücken verzahnte Dimere bilden, wodurch ein Glutaminrest fixiert wird und nicht mehr für eine Reaktion mit TGase zur Verfügung steht. Den selben Effekt erzielen Salzbrücken zwischen der basischen Lysinseitenkette und sauren Aspartyl- und Glutamyresten. Die räumliche *in silico*-Analyse der simulierten Tertiärstruktur legte nahe, dass ausschließlich Gln10, Gln58 und Gln96 (magenta eingefärbt in Abb. 78) frei zugänglich sind und damit Bindestellen von TGase sein könnten. Gleiches gilt für Lys44 und Lys73 (gelb eingefärbt). Die Lage dieser Aminosäuren im SSTI-Modell zeigte, dass sie alle außer Lys73 auf einer Seite des Proteins liegen. An der gegenüberliegenden Seite befindet sich das Dipeptid Lys80-Glu81 (grün eingefärbt). Diese beiden Aminosäuren werden in den Datenbanken als jene markiert, die für die Bindung an Subtilisin verantwortlich sind (Mitsui *et al.*, 1979; Hirono *et al.*, 1984; Kojima *et al.*, 1990, 1991). Die Hypothese über die Wirkung der Proteaseinhibitoren als Schutzschilde gegen sekretierte Proteasen koexistierender Organismen schließt einen Einbau der Proteine in die Hyphenhülle ein (Sarafeddinov *et al.*, 2011). Somit könnte auf eine bevorzugte Orientierung des Proteins geschlossen werden, wenn angenommen wird, dass die Proteasebindestelle innerhalb der hydrophoben, der Luft zugewandten Proteinhälfte lokalisiert ist, während die Seite, an der sich die für TGase potenziell zugänglichen Aminosäurereste befinden, die hydrophile Innenseite bildet, wo die Proteine von TGase vernetzt werden. Diese Hypothese muss jedoch experimentell belegt werden.

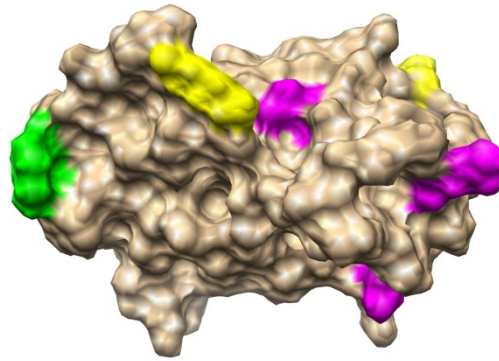


Abb. 78: Mutmaßliche Oberflächenstruktur des SSI von *S. mobaraensis* mit putativer Subtilisin-Bindestelle (grün) und putativ für TGase zugänglichen Aminosäuren (gelb, magenta): Das Modell wurde auf Grundlage der mittels PHYRE2 vorhergesagten Sekundärstrukturen und Abgleich mit Kristallstrukturen aus der Protein Data Base (PDB; www.pdb.org, Stand: Januar 2013) erstellt und anschließend mit der Software Chimera 1.4.1 visualisiert. In gelb markiert sind die Positionen der für TGase putativ zugänglichen Lys44 und Lys73. In magenta markiert sind die Positionen der für TGase putativ zugänglichen Gln10, Gln58 und Gln96. In grün markiert ist die putative Subtilisinbindestelle der homologen SSI (Mitsui *et al.*, 1979; Hirono *et al.*, 1984; Kojima *et al.*, 1990, 1991).

4.2. Das Dispaseautolyse-induzierende Protein

Ein weiteres Substrat der Transglutaminase, das gleichzeitig als Antagonist sekretierter Proteasen wirkt, ist das Dispaseautolyse-induzierende Protein (DAIP), für das auf Grundlage des bekannten N-Terminus keine Homologie zu bekannten Proteinen abgeleitet werden konnte, da kein entsprechendes Protein in den Datenbanken gelistet war. DAIP inaktiviert z.B. die neutralen Metalloproteasen Dispase von *Paenibacillus polymyxa* und Thermolysin von *B. thermoproteolyticus* *rokko* nicht in einem klassischen Proteinkomplex, sondern dadurch, dass durch Einwirken von DAIP die Autolyse der Proteasen eingeleitet wird. Daher ist DAIP auch nicht direkt als Inhibitor anzusehen sondern muss als inaktivierendes Protein bezeichnet werden, wobei der genaue Mechanismus unbekannt ist. Eine Wirkung als Chelatbildner konnte jedoch ebenso ausgeschlossen werden wie eine Wirkung als Endoprotease oder Aminopeptidase (Sarafeddin *et al.*, 2009). Ziel dieser Arbeit war eine weiterführende Charakterisierung des Proteins, um den Mechanismus aufzuklären und DAIP einer Enzymfamilie zuordnen zu können.

Da vorhergehende Untersuchungen bisher nur Indizien auf eine enzymatische Aktivität des DAIP lieferten, sollte im Rahmen dieser Arbeit der Beweis für eine Katalyse hierzu erbracht werden. Die Untersuchungen ergaben, dass die Autolyse von Dispase in Gegenwart von DAIP sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig ist (Abb. 52). Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine erneute Zugabe von Dispase zeitlich versetzt nicht zu einer Sättigung von DAIP mit dem Enzym führte, was für die Ausbildung eines Proteinkomplexes spräche (Abb. 53), und die Dispaseautolyse durch Inkubation von DAIP mit Serinproteaseinhibitoren wie AEBSF und TLCK verlangsamt wird. Da der letztgenannte Effekt jedoch nicht mit den Konzentrationen der Proteaseinhibitoren korrelierte und auch keine vollständige Inhibition auftrat, konnte ausgeschlossen werden, dass es sich beim untersuchten Protein um eine Serin- oder Cysteinprotease handelt. Vielmehr könnte es sich um eine unspezifische Reaktion der Inhibitoren mit dem Protein handeln. Alle beobachteten Effekte unterstützten jedoch die Hypothese, dass DAIP enzymatische Aktivität besitzt.

Ebenso deutet die Tatsache, dass DAIP durch Erhitzen mit SDS distinkte Peptidbindungen öffnet und nicht statistisch fragmentiert (Abb. 51), auf eine gerichtete Autolyse und damit erneut auf einen enzymatischen Mechanismus hin. Durch Zugabe von β -Mercaptoethanol in den SDS-Denaturierungspuffer im Vorfeld einer SDS-PAGE ließ sich zusätzlich zeigen, dass die Eigenfragmentierung zunimmt. Dies liegt wahrscheinlich an einer reduktiven Öffnung der einzig möglichen Cystinbrücke, wodurch es zu einer Konformationsänderung mit Freilegung labiler Peptidbindungen und verstärkter Autolyse kommt.

Zotzel *et al.* konnten bereits eine Aminopeptidaseaktivität ausschließen (Zotzel, 2002). Wegen der hohen Selektivität von Exopeptidasen sollte diese Untersuchung mit zusätzlichen Substratpeptiden erweitert werden (

Tab. 47). Hierbei bestätigte sich jedoch das Ergebnis. Ebenso zeigten Untersuchungen mit Casein und Hämoglobin als Universalsubstrate für Endoproteasen erneut, dass DAIP keine entsprechende Fragmentierungsaktivität aufweist. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von Dispase und Thermolysin, den Zielproteasen von DAIP, zeigte, dass diese am C-Terminus ein absolut konserviertes Ala-Val-Gly-Motiv aufweisen (Abb. 54). Dasselbe Sequenzmotiv zeigen weitere Mitglieder der Familie der M4-Proteasen auf, jedoch nicht die Thermolysin-ähnliche Metalloprotease TAMEP von *S. mobaraensis*, die an der TGase-Aktivierung beteiligt ist (Abb. 68). Dieses Enzym ist trotz seiner großen Homologie kein Substrat von DAIP (Sarafeddinov *et al.*, 2009). Wegen dieser Erkenntnisse wurde DAIP nachfolgend auf eine Carboxypeptidaseaktivität des DAIP hin untersucht. Hierzu wurde von Dispase das C-terminale Heptapeptid $\text{H}_2\text{N-KSFDVAG-COOH}$ synthetisiert, mit DAIP inkubiert und auf potenzielle Hydrolyseprodukte *via* HPLC-MS hin untersucht. Es ließen sich jedoch keine Spaltprodukte nachweisen (Abb. 57). Ebenso zeigte sich, dass das Heptapeptid nicht in der Lage war, die Autolyse von Dispase durch DAIP kompetitiv zu hemmen. Somit konnte gleichfalls ausgeschlossen werden, dass es sich bei DAIP um eine Carboxypeptidase handelt. Der Katalysemechanismus bleibt damit jedoch weiterhin ungeklärt.

Wie bereits bei SSTI war zu Beginn dieser Arbeit ausschließlich das N-terminale Peptid des DAIP bekannt (Abb. 50), und auch hier scheiterten Versuche, das codierende Gen mittels molekularbiologischer Methoden wie Southern Blot-Analyse zu identifizieren und daraus die Aminosäuresequenz abzuleiten. Ein Grund hierfür war, dass über Datenbankabgleich kein Protein identifiziert werden konnte, das eine zu DAIP homologe Struktur aufwies. Ebenso erwiesen sich Sequenzen innerer Peptide aus MALDI-TOF-TOF-Analyse, die in vorhergehenden Arbeiten identifiziert worden waren, als fehlerhaft. Daher wurde untersucht, ob es durch Verwendung einer Nutzungshäufigkeitstabelle der aminosäurecodierenden Nukleotidtripletts (Tab. 57) möglich sei, auf Grundlage des N-Terminus eine DNA-Sonde zu generieren, die selektiv mit dem entsprechenden Gen hybridisierte. Dies war jedoch wegen der Kürze der Sequenz nicht möglich. Daher gelang die

Aufklärung des DAIP-codierenden Gens ebenso wie bei SSTI erst später über Genomsequenzierung und bioinformatischen Datenbankabgleich.

Auf Grundlage der Genomdaten konnte das DAIP-codierende Gen zweifelsfrei identifiziert werden (Abb. 64). Die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz ergab wie erwartet ein N-terminales Signalpeptid, welches das Protein zu einem Transport durch die Plasmamembran befähigt. Nach der Hydrolyse des Signalpeptids besitzt DAIP eine Länge von 348 aa, von denen annähernd 50% zusätzlich über massenspektrometrische Analyse bestätigt wurden (unterstrichen in Abb. 64). Die kalkulierte Molmasse des reifen Proteins von 36 152.73 Da entspricht annähernd dem experimentell bestimmten Wert von 37 kDa (Sarafeddinov *et al.*, 2009), jedoch passt der theoretisch ermittelte *pI* von 5.29 nicht zum experimentellen Wert von 7.1-7.2.

Auch DAIP wurde hinsichtlich modifizierter Glutaminseitenketten analysiert. Das Protein besitzt fünf Glutaminreste, die für eine potenzielle Reaktion mit TGase zur Verfügung stehen, von denen drei mutmaßlich durch Wasserstoffbrücken fixiert sind. *In silico*-Analysen ergaben, dass womöglich nur Gln144 und Gln345 frei zugänglich sind. Ähnliches gilt für die exponierten Lysinreste. Von zehn potenziell verfügbaren Seitenketten sind mutmaßlich nur drei, Lys115, Lys160 und Lys214, für eine Reaktion zugänglich (Abb. 65). Die räumliche Anordnung zeigte, dass sich die putativen TGase-Bindestellen annähernd alle auf der gleichen Molekülseite befinden. Ob die große Differenz zwischen theoretischem und apparentem *pI* durch eine Anhäufung basischer Aminosäurereste an der Oberfläche des Proteins verursacht wird, konnte nicht geklärt werden. Eine Modellierung der Tertiärstruktur auf Grundlage einer errechneten Sekundärstruktur gab hierauf keine Hinweise. Es scheint eher so, als wären saure und basische Aminosäuren statistisch über das gesamte Protein verteilt.

Die Struktur des DAIP weist dem Modell nach ein *7-bladed-beta-propeller*-Motiv auf, jedoch lässt sich auch auf Grundlage dieser Struktur keine funktionelle Einordnung des Proteins machen, da sie bei vielen verschiedenen Proteinen auftritt. Auffällig an der Strukturvorhersage des DAIP ist jedoch ein

Fortsatz, der aus zwei antiparallelen β -Faltblättern durch den C-Terminus des Proteins gebildet wird. Jener Fortsatz bildet eine Art Rinne, die einen auffallend hohen Anteil saurer Aminosäurereste aufweist (Asp18, Glu292, Asp322, Glu342, Glu343). Dabei könnte es sich um ein aktives Zentrum handeln (Abb. 79). Dies würde im Hinblick auf die vermutete enzymatische Aktivität darauf hindeuten, dass DAIP zur Familie der Aspartyl- oder Glutamyproteasen zu zählen wäre. Eine Beobachtung, die ebenfalls für eine Aspartylproteaseaktivität sprechen würde, war die Inhibition von DAIP durch DMSO in linearer Abhängigkeit. Ein solcher Zusammenhang konnte bisher nur für die Aspartylprotease Pepsin festgestellt werden (Kesavulu *et al.*, 2005). Ob die Annahmen korrekt sind, muss jedoch in weiterführenden Untersuchungen belegt werden.

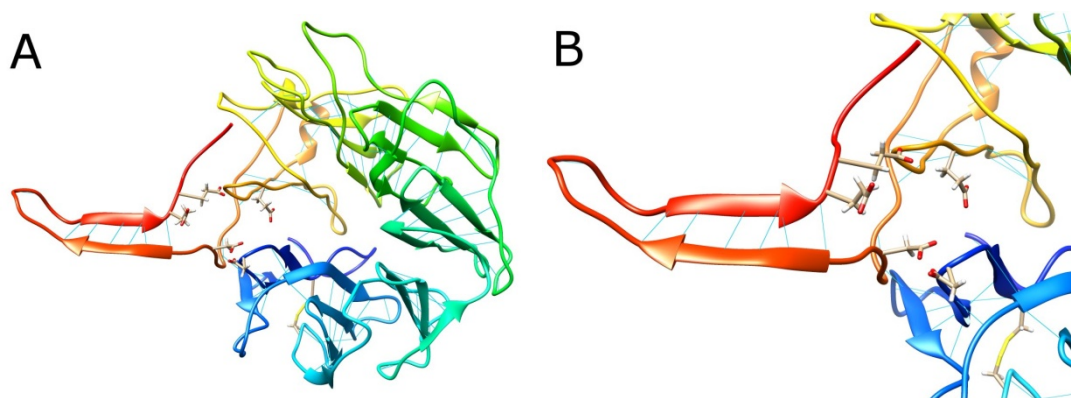


Abb. 79: Mutmaßliche Tertiärstruktur des DAIP von *S. mobaraensis* mit hervorgehobenen Aspartyl- und Glutamyresten der putativen Bindungsrinne:
 A: Dargestellt ist die Vorhersage der Tertiärstruktur (blau = N-Terminus, rot = C-Terminus). Das Modell wurde auf Grundlage der mittels PHYRE2 vorhergesagten Sekundärstrukturen und Abgleich mit Kristallstrukturen aus der Protein Data Base (PDB; www.pdb.org, Stand: Januar 2013) erstellt und anschließend mit der Software Chimera 1.4.1 visualisiert. In hellblau eingezeichnet sind die putativen H-Brücken, die putative Disulfidbrücke ist gelb markiert. Außerdem eingezeichnet ist die Lage der Aspartyl- und Glutamyreste in der putativen Bindungsrinne am C-terminalen Fortsatz des Proteins. B: Ausschnitt der putativen Bindungsrinne

Die beobachtete geordnete Autolyse von DAIP in Denaturierungspuffer sowie von Dispase in Gegenwart von DAIP deuten auf eine proteolytische Aktivität des DAIP hin. Gleichzeitig konnte jedoch bei Untersuchungen mit Universalsubstraten wie Casein und Hämoglobin kein Abbau nachgewiesen werden. Dadurch kam die Vermutung auf, dass es sich bei DAIP zwar um eine Endoprotease handeln könnte, diese jedoch hochspezifisch ein bestimmtes

Aminosäuremuster erkennt, welches in komplexen Proteasesubstraten nicht vorhanden ist. Diese Überlegungen veranlassten uns, die Primärstruktur verschiedener neutraler Metalloproteasen mit der von DAIP zu vergleichen (Abb. 80). Die Fragmentierungsmuster von autolysiertem DAIP ließen darauf schließen, dass im Inneren des Proteins solche Sequenzen vorhanden sein müssen, die erkannt und hydrolysiert werden (Abb. 51).

Thermolysin	SYDAPAVDAHYYAGVTYDYYKNVHNRLSYDGNNAIIESSVHYISQGYNNAFWNGS--QMVY	122
Stearolysin	SYDAPAVDAHYYAGVTYDYYKNVHNRLSYDGNNAIIESSVHYISQGYNNAFWNGS--QMVY	122
Bacilloolysin	AYDAAAVDAHYYAGKTYDYYKATFNRRNSINDAGAPLESTVHYGSYNNNAFWNGS--QMVY	123
Dispase	--DPAGVDAHAYAAKTYDYYKSKFGRNSIDGRGLQLFSTVHYGSYNNNAFWNGS--QMTY	115
Protease B	FNEPAAVDAHANAQAVYDYYSKTFGRDSFDQNGARITSTVHYVGKQWNNAAWNGV--QMVY	126
TAMEP	DPATAGVDAHYGQLTWDYKYNVHGRNGIRGDVGAYSRVHYGNNYVNAFWDDSCFCMTY	350
DAIP	LGSGSTWLTAATGGRAFAWEKNGGYLARVDGRTVTKLSSPSADIVGVGTDKARR-DHVRL	138

Thermolysin	NKNPD---WEIGEDVYTPGISGDSLRSMSDPKYGDPDHYSKRYTGTQDNGGVHINSGLI	237
Stearolysin	NKNPD---WEIGEDVYTPGISGDSLRSMSDPKYGDPDHYSKRYTGTQDNGGVHINSGLI	237
Bacilloolysin	NRNPD---WEIGEDIYTPGKAGDALRSMSDPTKYGDPDHYSKRYTGSSDNGGVHTINSGLI	238
Dispase	IQRKN---WLVGDDIYTPNICGDALRSMSNPTLYDQPHHYNLYKGSSDNGGVHTINSGLI	227
Protease B	ADRDD---WEIGEDVYTPGIAGDSLRSLEDPSKQGNPDHYSNRYTGTEDYGGVHINSGLI	236
TAMEP	NNPADPGDYLIKEKININGD-GTFLRYMDKPSKDGAS--KDAWYSGLGG-IDVHYSSGPA	460
DAIP	VTTDGGATWTAATGLSATAGGKSNLFAASVS-----PADRNVVYALGIDLVEAAENSGAE	247

Abb. 80: Sequenzalignment neutraler Metalloproteasen mit TAMEP und DAIP von *S. mobaraensis*: Dargestellt sind distinkte Aminosäuresegmente der angegebenen Proteine. Rot umrandet sind konservierte Aminosäuremuster.

Vergleichende Analysen der einzelnen Aminosäuresequenzen unter Berücksichtigung der Größe der Autolysebanden ergaben zwei Bereiche, die sowohl innerhalb der untersuchten neutralen Metalloproteasen als auch bei DAIP konserviert sind: ein Ser-(Ser/Thr)-Xaa, wobei Xaa eine hydrophobe Aminosäure darstellt, und ein weiter C-seitig gelegenes Asn-Ser-Gly-Motiv. Im erstgenannten Tripeptid weist die Metalloprotease TAMEP von *S. mobaraensis* an Position 2 einen basischen Argininrest auf. Dies könnte der Grund sein, warum TAMEP kein Substrat von DAIP ist. Betrachtet man die Größe der Autolysebanden, die durch Inkubation des DAIP in heißem Denaturierungspuffer entstehen, so kommen die in Tab. 56 angegebenen Fragmentpaare und die damit einhergehenden Hydrolysepositionen infrage. Das Fragmentpaar 23.6 kDa/12.5 kDa entspräche damit in etwa einer Hydrolyse des Sequenzmotivs Ser-Ser-Pro in erster Position.

Tab. 56: Potenzielle Autolyseposition von DAIP

Fragmentpaar	Hydrolysestelle in DAIP
21.2 kDa / 15 kDa	148
23.6 kDa / 12.5 kDa	117
25.5 kDa / 10.6 kDa	254

Autolyseuntersuchungen der Dispase in Gegenwart von DAIP ergaben eine distinkte Bande bei ca. 22.5 kDa (Abb. 52). Analysen hinsichtlich der Autolyseposition analog jener bei DAIP ließen hierbei, wenn von einem C-terminalen Fragment ausgegangen wird, auf Position 95 schließen. An dieser Position befindet sich bei Dispase das genannte Ser-Thr-Val-Motiv (Abb. 80). Dies ist ein erneuter Hinweis auf das homologe Tripeptid als spezifische Bindestelle von DAIP. Dass im Rahmen dieser Untersuchung keine Dispase-Fragmente nachgewiesen werden konnten, die den anderen in Tab. 56 genannten Hydrolysepositionen von DAIP entsprechen, legt nahe, dass die Öffnung einer Peptidbindung im Ser-Thr-Val- und nicht im Asn-Ser-Gly-Motiv die Dispaseautolyse induziert. Hierfür spricht auch, dass TAMEP an selber Position mit Ser-Arg-Val ein ähnliches Motiv besitzt, von DAIP jedoch nicht als Substrat erkannt wird (Sarafeddinov *et al.*, 2009). Die aus der Bioinformatik erhaltenen Informationen müssen in zukünftigen Studien experimentell bestätigt werden. Hierzu könnte die Kristallstruktur der neutralen Metalloprotease Gentlyase von *Paenibacillus polymyxa* von Nutzen sein, die kurz vor Abschluss dieser Arbeit publiziert wurde (Ruf *et al.*, 2013). Die Sequenzidentität zu Dispase beträgt 97%.

4.3. Der *Streptomyces*-Papaininhibitor

Das dritte bekannte Protein von *S. mobaraensis*, das sowohl TGase-Substrat als auch Proteaseinhibitor ist, ist der *Streptomyces*-Papaininhibitor (SPI) (Sarafeddinov *et al.*, 2011). Untersuchungen an diesem Protein machten den Großteil dieser Arbeit aus.

Zu Beginn dieser Arbeit war ebenso wie von DAIP und SSTI auch von SPI nur das N-terminale Peptid bekannt (Abb. 12), jedoch zeigten sich Homologien zu einem Protein von *S. lavendulae* (Q9X5U4). Dieses Protein ist während der Aufklärung eines Genclusters erstmals in Erscheinung getreten, an dessen Ende die Biosynthese des Antibiotikums Mitomycin C steht (Mao *et al.*, 1999). Auch wenn besagtem Protein hier keine direkte Funktion zugewiesen werden konnte, ließ nun neben der ähnlichen Sequenz auch eine funktionelle Homologie auf eine Verwandtschaft zu SPI hoffen, da diesem ebenfalls eine antibakterielle Wirkung unterstellt wurde.

Aus Sequenzabgleichen der beiden Proteine ließen sich solche Primer für die PCR ableiten, die es ermöglichten, eine selektive DNA-Sonde zu konstruieren (Abb. 13). Mithilfe dieser Sonde war es möglich, durch Southern Blot-Analyse und anschließendem Klon-Screening die vollständige Gen- und daraus abgeleitet die Aminosäuresequenz zu bestimmen (Abb. 20). Hierbei zeigte sich, dass SPI insgesamt fünf Cysteinreste besitzt, von denen sich der erste im Signalpeptid befindet (Abb. 22, Abb. 23). Es könnte sich hierbei um einen Ankerpunkt handeln, über den die Lokalisation des Proteins innerhalb der Zelle noch vor der Prozessierung geregelt wird. Die übrigen Cysteinreste befinden sich im reifen Protein und könnten durch Ausbildung von Disulfidbrücken zur großen Hitzestabilität des Proteins beitragen (Sarafeddin *et al.*, 2011).

Reifer SPI besitzt nach der Entfernung des 33 aa langen Signalpeptids drei Glutamin- und sechs Lysinreste, die potentiell für eine Vernetzung durch TGase zur Verfügung stehen (Abb. 22), und hat eine theoretische Molmasse von 12 027.72 Da sowie einen theoretischen pI von 8.77. Die theoretische Molmasse stimmt mit der apparenten von 12 kDa sehr gut überein, jedoch zeigte sich erneut eine Differenz zum apparenten pI, der von Sarafeddin *et al.* bei 7.3 festgestellt wurde (Sarafeddin *et al.*, 2011). Wie beschrieben stellten Schmidt *et al.* eine Deamidierung der Glutaminseitenketten fest, wenn während der Reaktion mit TGase kein Amidonor vorhanden ist (Schmidt *et al.*, 2008). Ein sukzessiver *in silico*-Austausch der Glutamin- durch Glutamatseitenketten veränderte den theoretischen pI von 8.43 (Modifikation eines Glutaminrests,

1 Q/E) zu 7.84 (2 Q/E) bis 6.76 (3 Q/E). Dies deutet darauf hin, dass TGase wenigstens an zwei Glutaminreste binden kann. Berechnungen der Sekundärstruktur auf Grundlage der Aminosäuresequenz und daraus abgeleitet eine Modellierung der Tertiärstruktur legen jedoch nahe, dass nur Gln6 hydratisiert ist, während Gln32 und Gln87 sich gegenseitig über H-Brücken fixieren (Abb. 43). Neben Gln6 stehen nach Auswertung des Modells nur Lys7 und Lys107 für eine Reaktion mit TGase zur Verfügung. Die anderen vier Lysinreste scheinen über Salzbrücken von Aspartyl- oder Glutamyresten fixiert zu werden. Auffallend an den putativ zugänglichen Aminosäuren ist, dass sie alle auf einer Seite des Proteins liegen (Abb. 43B). Dies spricht sehr für eine favorisierte Orientierung.

Zur Identifizierung der TGase- und Papain-Bindestellen und zur genaueren Betrachtung der zeitabhängigen Deamidierung sollte eine heterologe Produktion des SPI in *E. coli* stattfinden, der nachweislich kein TGase-codierendes Gen trägt (Blattner *et al.*, 1997). Hierbei zeigte sich jedoch, dass mit keinem Verfahren rekombinanter SPI (rSPI) produziert werden konnte, der gegen Papain reproduzierbar aktiv war (Abb. 25 - Abb. 28, Abb. 30, Abb. 31, Abb. 33). Dies wurde anfänglich mit einer Fehlfaltung des Proteins begründet, was sich jedoch später als falsch herausstellte. Genauere Untersuchungen am Wildtyp-Protein, das aus der Kulturbrühe von *S. mobaraensis* isoliert wurde, zeigten zweifelsfrei, dass SPI ein kofaktorbindendes Protein ist, und hierbei nicht der Träger, sondern der Kofaktor die inhibitorische Wirkung besitzt (Abb. 41). Reaktivierungsversuche des Proteins, dem im Vorfeld über Dialyse der Kofaktor entzogen worden war, mit verschiedenen Reagenzien wie Metallionen oder Detergenzien blieben erfolglos (Abb. 34 - Abb. 40). Reinigung und Strukturanalyse des gesuchten Kofaktors war im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich, jedoch zeigte eine erste HPLC-ESI-MS/MS-Untersuchung, dass ein organisches Molekül mit einer Molmasse von ca. 685.6 g mol^{-1} an das inaktive Transglutaminasesubstrat binden muss (Abb. 42). Eine Ähnlichkeit zu Mitomycin C, in dessen Zusammenhang das zu SPI homologe Protein von *S. lavendulae* identifiziert wurde, wurde wegen dessen geringerer Molmasse von 334 g mol^{-1} ausgeschlossen. Da es somit nicht möglich war, die korrekte

Faltung des rSPI zu belegen, kann im Nachhinein nur spekuliert werden, ob die heterologe Produktion über eine der angewandten Methoden erfolgreich war.

Die Aktivität gegen Papain, die im Verlauf der heterologen Produktion beobachtet wurde, ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass fehlgefalteter SPI Cysteinreste präsentiert, die mit dem Cystein im Aktivzentrum des Papains eine Disulfidbrücke ausbilden und hierdurch das Enzym anscheinend inaktiveren. Derselbe Effekt wurde bereits bei Transglutaminase beobachtet, bei der es durch Dimerisierung zu einer scheinbaren Inaktivierung des Enzyms kommt (Gebauer, 2010).

Um weitere Informationen über die Funktion von SPI zu erhalten, wurde die Primärstruktur mit bekannten Proteinen verglichen. Die Suche ergab nur Homologien zu putativen Proteinen, die meist aus der Familie der Lipoproteine stammten (Tab. 45). Dem widersprach das Signalpeptid, dessen N-terminale Sequenz nicht die typischen Aminosäuren besitzt, an die Prolipoproteinsignalpeptidasen binden (Inouye *et al.*, 1983a, 1983b; Paetzel *et al.*, 2002). Allerdings sollte SPI nach unserer Vorstellung auch nicht die äußere Cytoplasmamembran dekorieren. Berechnungen der Sekundärstruktur und daraus abgeleitet der Tertiärstruktur ließen auf eine funktionelle Homologie zu Glykosylhydrolasen der Familie 45 schließen (Abb. 44). Diese Enzyme hydrolysieren polymere Zucker. Erste Untersuchungen, mit Dextran, Saccharose, Agarose, Stärke, Cellulose, Carboxymethylcellulose und Chitin eine Glykolaseaktivität bei SPI nachzuweisen, blieben erfolglos. Somit war am Ende dieser Arbeit wie bei DAIP auch die exakte Funktion des proteinösen Anteils von SPI unklar. Möglicherweise ist das Protein nur ein durch Transglutaminase in die äußere Membran eingebautes Vehikel, das einen beweglichen Inhibitor trägt. Dies muss ebenso wie die konkrete Struktur des Kofaktors in Folgeuntersuchungen aufgeklärt werden.

Die Hypothese der Funktion der drei proteinösen Proteaseinhibitoren von *S. mobaraensis* als Schutzschilde gegen sekretierte Proteasen koexistierender Organismen führte zu Untersuchungen hinsichtlich der inhibierenden Aktivität des SPI gegen Cysteinproteasen pathogener Bakterien. Cysteinproteasen sind

in der belebten Natur weit verbreitet und dienen dabei häufig als molekulare Waffen (Shindo und Van der Hoorn, 2008; Bleischwitz *et al.*, 2010). Auch wenn diese Enzyme bei Prokaryonten unterrepräsentiert sind, sind sie wegen der aufkommenden Resistenz gegen konventionelle Antibiotika als neue Angriffspunkte gegen pathogene Keime von großem medizinischem Interesse (Potempa und Pike, 2005; Rudenskaya und Pupov, 2008; Robinson und Dalton, 2011). Diese Überlegungen führten zur Untersuchung von SPI als Inhibitor gegen die Cysteinproteasen Gingipain K und R1 von *Porphyromonas gingivalis* (nachfolgend als KGP und RPG bezeichnet), einem pathogenen Mundbakterium, welches für die Ausbildung der Zahnfleischentzündung (Gingivitis) verantwortlich ist. Auch wenn nachgewiesen werden konnte, dass SPI ein kofaktorbindendes Protein ist, bei dem der Kofaktor der eigentliche papaininhibierende Partner ist, wurden die Untersuchungen mit dem Holoprotein durchgeführt, welches direkt aus der Kulturbrühe von *S. mobaraensis* isoliert wurde. Da bei keinem anderen Protein, das im Rahmen der TGase-Forschung in Erscheinung getreten ist, eine inhibierende Wirkung gegen Cysteinproteasen nachgewiesen werden konnte, wurde auf eine sehr hohe Affinität des SPI zu seinem Kofaktor geschlossen. Dies erlaubte eine vereinfachte Isolation und Aufreinigung des Proteins, weswegen dieses für die Untersuchungen eingesetzt wurde.

Hierbei zeigte sich, dass Holo-SPI die sekretierten Proteasen KPG und RPG in der Kulturbrühe von *P. gingivalis* im nanomolaren Bereich hemmt, wobei die Aktivität gegen RPG um eine Größenordnung niedriger lag (Abb. 45, Abb. 46). Unerwarteterweise zeigte sich im Rahmen dieser Untersuchung, dass ebenfalls eine unbekannte Protease in der Kulturbrühe des pathogenen *B. anthracis* gehemmt wurde. Dies war so nicht zu erwarten, da im Genom des Organismus kein Gen vorhanden ist, das für eine sekretierte Cysteinprotease codiert (Read *et al.*, 2003). Da Holo-SPI neben Cystein- auch Serinproteasen hemmt, jedoch im höhernmolaren Bereich (Sarafeddinov *et al.*, 2011), wurde hierbei auf die Hemmung einer entsprechenden Serinprotease geschlossen.

Gram-positive und Gram-negative Bakterien besitzen papainähnliche Zellwandhydrolasen (Lukomski *et al.*, 1999, Park und Uehara, 2008), welche

potentiell einen Angriffspunkt für Holo-SPI darstellen könnten. Daher wurde nachfolgend die wachstumsinhibierende Wirkung des Holoproteins auf *B. anthracis* (Abb. 47A), *E. coli*, (B), *Pseudomonas aeruginosa* (C), *Staphylococcus aureus* (D) *Vibrio cholerae* (E) und *Yersinia pestis* (F) untersucht. Hierbei zeigte sich, dass bereits eine Konzentration von 2.5 μM Holo-SPI in der Submerskultur das Wachstum aller getesteten Organismen für Stunden verzögerte, während 5 μM Holo-SPI das Wachstum von *E. coli* vollständig und von *V. cholerae* annähernd vollständig inhibierte. Bei einer Inkubation mit 10 μM Holo-SPI kam das Wachstum aller getesteten Organismen vollständig zum Erliegen, jedoch bildeten *Y. pestis*, *P. aeruginas* und *B. anthracis* nach Überimpfen auf SPI-freies Medium neue Kolonien, während *V. cholerae* auch nach 72 h Inkubation kein erneutes Wachstum zeigte (Abb. 48). Nach diesen Ergebnissen ist Holo-SPI eher als Bakteriostatikum einzuordnen, wenn auch eine bakterizide Wirkung auf *V. cholerae* vorhanden ist. Möglicherweise fehlt *V. cholerae* ein essenzielles Enzym, das Holo-SPI inaktivieren kann.

Da es sich bei allen getesteten Bakterien um Mitglieder vollkommen verschiedener Gattungen handelte, wurde angenommen, dass Holo-SPI Einfluss auf solche Hydrolasen nimmt, die in allen Bakterien vorkommen, und daher zeitlich in einem frühen Evolutionsstadium entstanden sein müssen. Untersuchungen mit dem Holoprotein auf eine Wirkung gegen Säugerzellen zeigten zusätzlich, dass keine Zytotoxizität vorliegt (Abb. 49). Das Ergebnis spricht erneut gegen eine Verwandtschaft des Kofaktors mit Mitomycin C, das heute meist als zytotoxisches Antibiotikum in der Krebstherapie eingesetzt wird (Henderson, 1993; Tomasz und Palom, 1997; Spanswick *et al.*, 1998). Somit muss in Zukunft untersucht werden, welche bakteriellen Hydrolasen von Holo-SPI angegriffen werden, um so ggf. einen konkreten medizinischen Nutzen definieren zu können.

4.4. Chapline und Rodline

Nach der Keimung bilden *Streptomyces* unter optimalen Bedingungen auf feuchtem Boden ein weit verzweigtes Substratmyzel aus. Kommt es zur Erschöpfung an Nährstoffen, so differenziert das Substrat- zum Luftmyzel, welches durch Sekretion amphiphiler Moleküle die Oberflächenspannung des Wassers senken und dadurch in die Luft wachsen kann. Hierbei werden auf dem hydrophilen Peptidoglycan hydrophobe Proteinschichten aufgebaut, die ein Austrocknen verhindern und eine zusätzliche Barriere für den geregelten Stoffaustausch darstellen.

Eine der Proteinschichten der Hülle von Streptomyceten, der sog. Rodlet-Layer, besteht aus mindestens zwei Strukturproteinen (Wildermuth *et al.*, 1971; Smucker und Pfister, 1978; Willey *et al.*, 1991; Chater, 2011). Das sind zum einen die Rodline, die jedoch nur ordnenden Charakter bei der Ausbildung der typischen Mosaikstruktur haben, und zum anderen die Chapline (Claessen *et al.*, 2002, 2003, 2004; Elliot *et al.*, 2003). Letztere, von denen zwei unterschiedliche Arten bekannt sind, sind für die Ausbildung und Funktionalität der Hülle essenziell (Claessen *et al.*, 2004). Ob *S. mobaraensis* analoge Proteine besitzt, war vor dieser Arbeit nicht bekannt. Da den drei in dieser Arbeit untersuchten Proteaseinhibitoren eine hypothetische Funktion als Schutzschild gegen sekretierte Proteasen koexistierender Organismen zugeschrieben wird, müssen diese ebenfalls Bausteine jener Proteinhülle sein (Sarafeddin *et al.*, 2011). Dies war der Grund, das Genom von *S. mobaraensis* auf rodlin- und chaplincodierende Gene zu untersuchen.

Während bei *S. coelicolor* A3(2) sowie *S. lividans* jeweils zwei nicht redundante Rodline nachgewiesen werden konnten, besitzt *S. venezuelae* drei entsprechende Proteine. Southern Blot-Analysen lieferten Hinweise auf entsprechende Gene in den Genomen drei weiterer *Streptomyces*-Arten, jedoch ist mit *S. avermitilis* bereits auch ein Stamm beschrieben, der kein Rodlin produzieren kann (Claessen *et al.*, 2002; Ikeda *et al.*, 2003; Bibb *et al.*, 2012). Im Genom von *S. mobaraensis* ließen sich über lokalen Datenbankabgleich auf Grundlage der Primärstrukturen der zwei Rodline von *S. coelicolor* A3(2) im

Rahmen dieser Arbeit drei putative rodlin-codierende Gene identifizieren. Dabei fiel vor allem der Unterschied in der genetischen Organisation auf. Während die beiden Gene bei *S. coelicolor* A3(2) direkt aufeinander folgend auf Plus- und Minusstrang eines DNA-Abschnitts organisiert sind (Claessen *et al.*, 2002), ist bei *S. venezuelae* eine ähnliche Organisation nur für zwei der drei Gene beschrieben. Die codierenden Gene für RdlB und RdlC liegen hier direkt aufeinander folgend auf Plus- und Minusstrang eines DNA-Abschnitts. Das RdlA-codierende Gen hingegen befindet sich *upstream* des *rdlB*-Gens in einiger Entfernung (Bibb *et al.*, 2012). Im Genom von *S. mobaraensis* sind ebenfalls nur zwei der drei Gene direkt hintereinander organisiert (Abb. 71). Ob das verbleibende *rdl3*-Gen auf dem Genom von *S. mobaraensis* jedoch eine ähnliche Anordnung hat wie das *rdlA*-Gen auf dem Genom von *S. venezuelae*, konnte wegen der am Ende dieser Arbeit noch nicht vollständig vorliegenden Genomsequenzen nicht belegt werden.

Hinsichtlich Molmasse und Identität stimmen die drei putativen Rodline von *S. mobaraensis* gut überein (Abb. 70). Besonders auffällig ist hier die hohe Aminosäureidentität von Rdl1 zu Rdl3, welche nach Abtrennung der Signalpeptide annähernd 85% beträgt. Hier ist somit nicht auszuschließen, dass beide Proteine funktionell gegeneinander austauschbar sind. Dies müssen jedoch weitere Untersuchungen belegen. Ebenso stimmen die drei putativen Rodline von *S. mobaraensis* gut mit den Analoga anderer Streptomyceten überein, jedoch erwartungsgemäß nicht mit der hohen stamminernen Identitäten (Tab. 50). Trotzdem lässt schon die genetische Anordnung von *rdlA* und *rdlB* von *S. coelicolor* A3(2) bzw. *S. lividans* (Claessen *et al.*, 2002), *rdlB* und *rdlC* von *S. venezuelae* (Bibb *et al.*, 2012) sowie *rdl1* und *rdl2* von *S. mobaraensis* auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung schließen.

Neben Rodlinen sind Chapline an der Ausbildung der Hyphenhülle beteiligt, diese jedoch für eine Funktionalität essenziell. So konnte gezeigt werden, dass Chaplin-Deletionsmutanten nicht mehr zur Ausbildung eines funktionierenden Luftmyzels und damit einhergehend auch nicht mehr zur in der Folge eintretenden Sporulation befähigt sind (Claessen *et al.*, 2004). Chapline lassen sich allgemein in zwei Gruppen unterteilen, die kurzen sowie die langen

Chapline. Alle Chapline bestehen aus einem Signalpeptid, welches zum Transport über den Sec-Signalweg befähigt, und einer sog. Chaplindomäne mit hohem Anteil an β -Faltblattsegmenten, die ein- (Kurzversion) oder zweimal (Langversion) auftritt. Diese Domäne zeichnet sich durch einen hohen Anteil nicht konservierter hydrophober Aminosäuren von 60-65% aus. Vollständig konserviert ist ein Gly-Asn-Motiv, das in jeder Domäne dreimal auftritt und für die native Struktur unerlässlich zu sein scheint. So verursacht dieses Dipeptid offensichtlich eine Schleife, die die β -Faltblatt-Untereinheiten von einander trennt. Durch Ausbildung einer Disulfidbrücke über Cysteinreste, die jeweils C-seitig von der zweiten und der dritten GN-Schleife angeordnet sind, wird diese Domänenstruktur weiter stabilisiert. Lange Chapline besitzen C-terminal ein LAXTG-Sortasebindemotiv, worüber das Protein im Peptidoglycan verankert werden kann. Zwischen LAXTG und der zweiten Chaplindomäne spannt sich ein großer Bereich auf, der vom Peptidoglycan bis zur Hyphenhülle reicht. Der äußere Proteinfilm entsteht sehr wahrscheinlich durch Selbstassemblierung zwischen den einzelnen Chaplindomänen und wird von den Rodlinien unterstützt (Claessen *et al.*, 2003; Elliot *et al.*, 2003; Capstick *et al.*, 2007, 2011; Di Berardo *et al.*, 2008; Sawyer *et al.*, 2011).

Die Anzahl der Chapline variiert innerhalb der Streptomyceten. Während z.B. *S. coelicolor* A3(2) Gene für drei lange und fünf kurze Chapline aufweist (Elliot *et al.*, 2003), kann *S. venezuelae* höchstens zwei lange und vier kurze Chapline produzieren (Bibb *et al.*, 2012). Die Analyse des *S. mobaraensis*-Genoms ergab ebenfalls insgesamt sechs putative Gene für ein langes (Chp1) und fünf kurze (Chp2 - 6) Chapline. Alle putativen Chapline von *S. mobaraensis* weisen die typische Domänenstruktur auf (Abb. 72), wobei das Sortasebindemotiv von Chp1 durch ein LAHTG-Pentapeptid dargestellt wird. Bei der Sortase SrtB von *Staphylococcus aureus* ist das LPXTG-Bindemotiv von StrA durch ein NPQTN-Motiv ersetzt (Mazmanian *et al.*, 2002), was darauf hindeutet, dass unterschiedliche Enzyme unterschiedliche Substrate besitzen. Das bei ChpA bis C von *S. coelicolor* A3(2) auftretende LAXTG-Motiv (hier: X = E (ChpA), H (ChpB) bzw. E (ChpC)) lässt mehr auf ein Einwirken einer SrtA-ähnlichen Sortase schließen, von denen bisher zwei im Genom von

S. coelicolor A3(2) nachgewiesen wurden (Pallen *et al.*, 2001; Bentley *et al.*, 2002). Gleiches gilt somit wohl auch für die Sortase, die das Motiv von Chp1 erkennt.

Die fünf kurzen Chapline von *S. mobaraensis* stimmen sehr gut mit den 50-60 aa langen reifen Polypeptiden von *S. coelicolor* A3(2) überein. Das lange Chp1 ist jedoch ca. 40-60 aa länger als ChpA bis C (210-230 aa im reifen Zustand, vgl. Tab. 52), wobei diese Massenzunahme größtenteils auf den Bereich zwischen der zweiten Chaplindomäne und dem Sortasebindemotiv entfällt. Ebenso charakteristisch ist der Aufbau dieses verlängerten Bereichs, der sich durch einen hohen Anteil an Histin- und Prolinresten von jeweils ca. 20% auszeichnet (einfach unterstrichen in Abb. 72). Ein ähnlicher Aufbau ist für das eukaryontische *Histidine-proline-rich Glycoprotein* (HPRG) beschrieben. Bei HPRG des Kaninchens macht die sog. His/Pro-reiche Domäne ca. 32% des gesamten Proteins aus (Borza *et al.*, 1996). Solche Domänen dienen hier als Bindestelle für verschiedene Liganden wie Porphyrin oder Übergangsmetalle (Morgan, 1978), Stoffe aus der Blutgerinnung wie z.B. Heparin (Lijnen *et al.*, 1983) oder Plasminogen (Lijnen *et al.*, 1980), oder aber für Komponenten des Immunsystems wie T-Zellen (Saigo *et al.*, 1989) oder Makrophagen (Chang *et al.*, 1992). Zusammengefasst dienen HPRG als Transport- oder Speicherort von Liganden, die in eukaryontischen Systemen an verschiedenen Vorgängen beteiligt sind. Gleiches könnte somit auch für die Domäne bei Chp1 gelten. Hier könnten ebenfalls Stoffe gespeichert werden, die zu einem späteren Zeitpunkt lokal verwendet werden. Ebenfalls auffallend an der Struktur von Chp1 im Vergleich zu den langen Chaplinen von *S. coelicolor* A3(2) ist der hohe Anteil an Histidin- und Glycinresten zwischen den beiden Chaplindomänen (doppelt unterstrichen in Abb. 72). Eine ähnliche Domäne befindet sich am N-Terminus von Spinalin, einem Protein des Süßwasserpolyphen *Hydra magnipapillata* (Koch *et al.*, 1998), und von Loricrin, dem durch Transglutaminase vernetzbaren Hauptbestandteil des *Cornified Envelope* (CE) der Haut (Mehrel *et al.*, 1990; Steinert *et al.*, 1991; Mehling *et al.*, 1995b). Beide Proteine sind an der Ausbildung supramolekularer Strukturen beteiligt. Innerhalb der Domäne kann es zur Ausbildung von sog. Glycin-Schleifen kommen, die durch ihre hohe

Flexibilität ohne geordnete Sekundärstrukturen auffallen (Steinert *et al.*, 1991). Da Chapline ebenfalls Strukturproteine sind, sollten ihre His/Gly-reichen Domäne wie die der genannten eukaryontischen Proteine fungieren.

Einen ähnlichen Aufbau wie Chp1 in dem genannten Bereich zeigt bei *S. coelicolor* A3(2) nur ChpC, welches als einziges unter den langen Chaplinen essenziell für den Aufbau einer wildtypähnlichen Hyphenhülle ist (Di Berardo *et al.*, 2008). Auch wenn Duong *et al.* zeigen konnten, dass auch ohne das Vorhandensein von ChpC eine funktionale, jedoch dem Wildtyp unähnliche Hyphenhülle aufgebaut werden kann (Duong *et al.*, 2012), unterstreicht die Tatsache, dass *S. mobaraensis* gerade jenes lange Chaplin als einziges produziert, dessen Relevanz für den korrekten Aufbau der Hülle. Ob die Verlängerung des Proteins und die His/Pro-reiche Domäne Einfluss auf die unterschiedlichen Oberflächenstrukturen von *S. coelicolor* A3(2) und *S. mobaraensis* haben, konnte an dieser Stelle nicht untersucht werden.

Auch ein Vergleich der aus der DNA von *S. mobaraensis* und *S. coelicolor* A3(2) abgeleiteten Primärstrukturen zeigte große Homologien zwischen den kurzen Chaplinen, jedoch war es nicht möglich, Analoga konkret zuzuordnen (Abb. 73, Tab. 53, Tab. 54). Speziell zeigte keines der fünf kurzen Chapline von *S. mobaraensis* Verwandtschaft zu ChpE, dem durch einen fehlenden Cysteinrest am C-Terminus eine abweichende Funktion zugesprochen wurde (Elliot *et al.*, 2003). Daher konnte jeder weitere funktionelle Vergleich nur spekulativ bleiben.

Rodline und Chapline bilden im gewachsenen Luftmyzel eine Proteinschicht, aus der sie nur unter denaturierenden Bedingungen isoliert werden konnten. So zeigten Elliot *et al.*, dass ihre Isolation ein Auskochen der Zellmembran mit SDS benötigte. Der Rückstand mit den Zielproteinen war dann nur in Trifluoressigsäure löslich (Elliot *et al.*, 2003). Eine Extraktion von Transglutaminase oder der drei untersuchten Proteaseninhibitoren aus Zellen einer sporulierenden Plattenkultur war bisher unter nativen Bedingungen ebensowenig möglich (Zotzel, 2002; Schmidt, 2008). Dies könnte ein weiterer Beleg dafür sein, dass die im Zusammenhang mit der TGase-Forschung

untersuchten Porteine ebenfalls in die Lufthyphenhülle eingebaut werden und hier ihre antibakterielle Wirkung entfalten.

Eine Strukturanalyse von Glutamin- und Lysinresten zeigte, dass reife Rodline von *S. mobaraensis* acht bis neun Glutaminreste besitzen, was annähernd 10 Prozent der gesamten Aminosäuren entspricht. Zusätzlich sind ein bis vier Lysinreste vorhanden (Tab. 51). Besonders auffällig an der Anordnung der Glutaminreste erschien ein Bereich um die Position 75. Hier zeigen Rdl1 und Rdl3 ein QEQQ-Tetrapeptid, während bei Rdl2 die drei Glutaminreste sogar direkt aufeinander folgen (Abb. 70). RdlA (Q7AY50) und RdlB (Q934F8) von *S. coelicolor* A3(2) zeigen an der besagten Stelle nur ein QQ-Dipeptid. Nachweislich sind Glutamindubletts bevorzugte Bindestellen von TGase (Ando *et al.*, 1989; Candi *et al.*, 1995; Hohenadl *et al.*, 1995; Christensen *et al.*, 1996). *S. coelicolor* A3(2) besitzt kein TGase-codierendes Gen (Bentley *et al.*, 2002). Es könnte jedoch trotzdem möglich sein, dass alle Proteine denselben Ursprung besitzen, wobei die Rodline von *S. mobaraensis* zusätzlich als Gerüstproteine für die Inhibitorproteine fungieren. Die Erstellung eines *in silico*-Modells der Rodline, wie dies bei den Inhibitorproteinen gelang, war jedoch im Rahmen dieser Arbeit wegen fehlender Kristallstrukturen in den Datenbanken nicht möglich. Daher können keine weiteren Vermutungen über hydratisierte und einer Vernetzung durch TGase zur Verfügung stehende Glutamin- und Lysinreste angestellt werden.

4.5. Aufbau der Lufthyphen

In der Annahme, dass die im Rodlet-Layer organisierten Chapline und Rodline eine Grundfläche für eine weitere Schicht bilden, die durch Einbau der in dieser Arbeit beschriebenen proteinösen Proteaseninhibitoren DAIP, SPI und SSTI gebildet wird, entwickelte der Autor dieser Arbeit den nachstehenden hypothetischen Aufbau für die äußere Hyphenhülle, und verband damit gesicherte Erkenntnisse früherer Arbeiten mit jenen, die in der vorliegenden Arbeit erlangt wurden. Der hypothetische Aufbau unter Einbeziehung aller beschriebenen Fakten ist in Abb. 81 dargestellt.

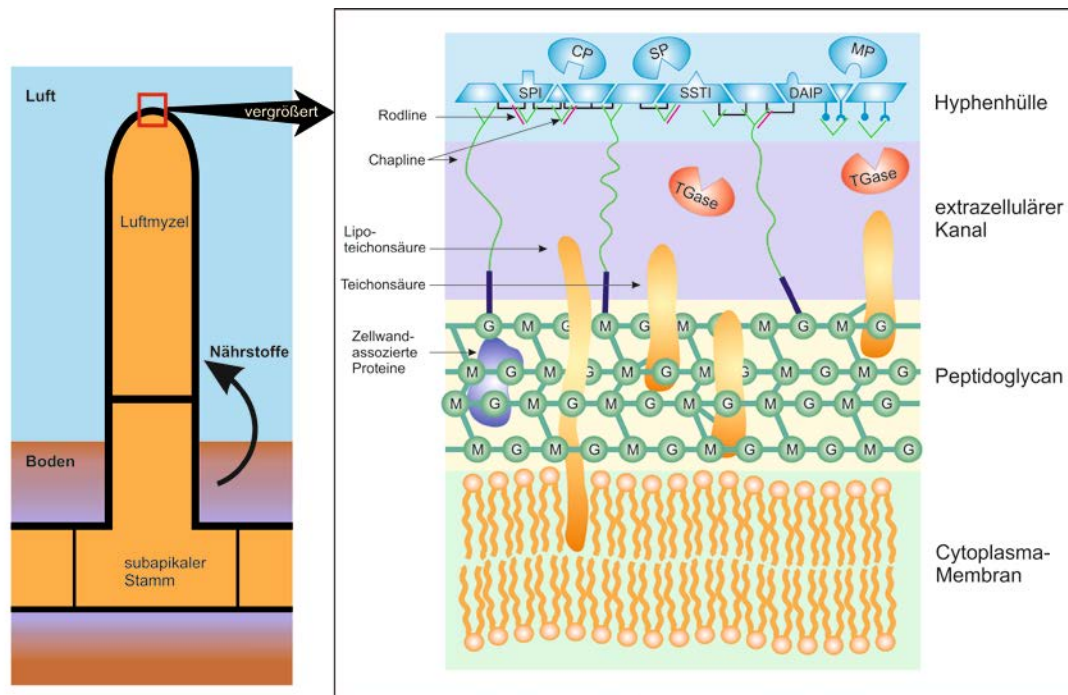


Abb. 81: Schematische Darstellung des extrazellulären Kanals eines Luftmyzels von *S. mobaraensis* nach Vorstellung des Autors: Links: Darstellung der wachsenden Lufthyphe aus dem Boden (braun) in die Luft (blau). Die Nährstoffe, die durch einen apoptoseähnlichen Autolyseprozess des subapikalen Stamms freigesetzt werden, werden über dessen Zellwand in den extrazellulären Kanal (rechts) transportiert und gelangen hier über Osmose an die Spitze der Lufthyphe, wo diese weiter wächst (Chater, 2011). Rechts: Darstellung des extrazellulären Kanals und Einbau der proteinösen Proteaseinhibitoren nach der Vorstellung des Autors. Die langen Chapline Chp1 sind über die Sortasebindestelle mit dem Peptidoglycan verknüpft und spannen über die His/Pro-reiche Domäne den extrazellulären Kanal auf. Über die Chaplindomänen im N-Terminus von Chp1 bildet sich durch Heteropolymerisation mit den Chaplindomänen der kurzen Chp2 - 5 unterstützt von den Rodlines der Rodlet-Layer aus. Auf dieser Oberfläche befinden sich die drei proteinösen Proteaseinhibitoren von *S. mobaraensis* DAIP, SPI und SSTI, die von TGase verknüpft werden und gegen Angriffe sekretierter Cystein- (CP), Metallo- (MP) oder Serinproteasen (SP) schützen. Gemeinsam mit dem Rodlet-Layer und anderen, nicht eingezeichneten Schichten, könnte somit die Hyphenhülle gebildet werden. Graphische Darstellung: L. Henkes

Das weit verbreitete Substratmyzel dient den Streptomyceten dazu, Nährstoffe aus feuchtem Boden, auf dem das Myzel gewachsen ist, aufzunehmen (Chater, 1993). Kommt es zur Erschöpfung der Nährstoffe oder zu einer allgemeinen Verschlechterung der Lebensbedingungen, so erfolgt die Sekretion von SapB, einem kleinen Peptid, welches die Oberflächenspannung des feuchten Substrats senkt. Gleichzeitig werden kleine Chapline ins Medium sekretiert. Während SapB im Boden verbleibt und so die Oberflächenspannung konstant niedrig hält, aggregieren die Chapline jedoch über die Chaplindomänen und lagern sich auf der hydratisierten Zellwand ab. Hierdurch

wird eine hydrophobe Oberfläche gebildet, die einerseits das Wachstum aus dem hydrophilen Untergrund ermöglicht und andererseits gleichzeitig vor Austrocknung schützt (Richter *et al.*, 1988; Willey *et al.*, 1991; Wösten und Willey, 2000; Claessen *et al.*, 2003; Chater, 2011).

Im weiteren Differenzierungsprozess wird der Bereich des Substratmyzels, der sich direkt unterhalb des wachsenden Luftmyzels befindet, in einem apoptoseähnlichen Prozess autolysiert. Dieser subapikale Stamm stellt damit die Nährstoffe zur Verfügung, die für das Wachstum der Lufthyphen benötigt werden (Chater, 2011). Gleichzeitig mit dem Beginn des Wachstums der Lufthyphen erfolgt die Synthese verschiedener Sekundärmetaboliten, darunter auch Antibiotika, die entweder in die Umgebung sekretiert werden oder auf der Hyphenoberfläche, speziell im Bereich zwischen Substrat- und Luftmyzel verbleiben (Chater, 1998; Bibb, 2005; Manteca *et al.*, 2008). Das Wachstum der Lufthyphe findet an den Spitzen der einzelnen Äste des Luftmyzels statt (Chater, 2011). Um einen aufwendigen Transport der Nährstoffe, die durch Autolyse des subapikalen Stamms frei werden, über die einzelnen Zwischenwände innerhalb der Lufthyphe zu umgehen, werden diese einmal über die Wand des subapikalen Stamms transportiert, und befinden sich hier in einem extrazellulären Kanal, der sich zwischen der hydrophilen Zellwand und der hydrophoben Hyphenhülle rund um das gesamte Luftmyzel zieht. Hier gelangen die Nährstoffe über Osmose an die wachsenden Spitzen des Myzels (Chater und Chandra, 2006; Chater *et al.*, 2010a). Unterstützend zur Osmose wirkt hierbei eine stärkeähnliche, faserige Cellulose-Struktur an der Spitze des Myzels, über die Wasser nach außen gelangt und verdunstet. Hierdurch entsteht dauerhaft ein Sog, der die Nährstoffe zur Spitze befördert (Xu *et al.*, 2008; Chater *et al.*, 2010a).

Dieser extrazelluläre Raum wird von der Histidin- und Prolin-reichen Domäne des langen Chaplins Chp1 strebenartig durchzogen, das wiederum über seine C-terminale Sortasebindestelle im Peptidoglycan verankert ist (Fischetti, 2000; Elliot *et al.*, 2003). Die Chaplindomänen im N-Terminus des Proteins bilden nach Aggregation mit den Chaplindomänen der kurzen Chapline unter Hilfestellung der drei Rodline die Hülle aus, auf der wiederum die drei

bekannten und in dieser Arbeit charakterisierten Proteaseinhibitoren angelagert und durch Transglutaminase miteinander verknüpft sind (Claessen *et al.*, 2003; Elliot *et al.*, 2003; Capstick *et al.*, 2007, 2011; Di Berardo *et al.*, 2008; Sawyer *et al.*, 2011). Die zeitliche Korrelation zwischen Luftmyphenwachstum und Antibiotikasyntese deutet darauf hin, dass diese größtenteils dazu genutzt werden, die Nährstoffe aus dem autolysierten Substratmyzel, die sich im beschriebenen extrazellulären Raum befinden, vor parasitierenden Bakterien oder Pilzen zu schützen (Chater und Merrick, 1979). Eine ähnliche Schutzfunktion wird den drei Proteaseinhibitoren zugeschrieben (Sarafeddin *et al.*, 2011). Diese könnten als lokale Schutzschilde des Luftmyzels selbst dienen, während die sekretierten, beweglichen Antibiotika die Nährstoffversorgung und damit die Sporulation und den Fortbestand des Organismus in der Ferne absichern.

4.6. Charakterisierung weiterer Proteine von *S. mobaraensis*

Neben der Untersuchung der drei proteinösen Proteaseinhibitoren, der Aufklärung der hüllenbildenden Chapline und Rodline war ein Teil dieser Arbeit eine exaktere Beschreibung von Proteinen, die für den Export und die Prozessierung von Transglutaminase von Bedeutung sind.

4.6.1. Die Transglutaminase-aktivierende Metalloprotease

Die geregelte Prozessierung der Transglutaminase ist wegen ihrer Funktion, die bei unkontrollierter Aktivität für die Zelle tödlich ist, von größter Bedeutung. Frühere Arbeiten der AG Fuchsbauer entschlüsselten einen komplexen Aktivierungsmechanismus. Hierbei wird das als Prä-Pro-Enzym translatierte Protein nach dem Durchtritt durch die Plasmamembran von einer nicht näher bestimmten Signalpeptidase hydrolysiert (Silhavy *et al.*, 1983; Eckhardt *et al.*, 1987; Braun und Tommassen, 1998). Das weiterhin inaktive Zymogen wird in

der Folge durch Einwirken der Transglutaminase-aktivierenden Metalloprotease (TAMEP) durch proteolytische Entfernung des Propeptids aktiviert. In einem abschließenden Schritt erfolgt durch das Einwirken einer Prolyl-Tri-/Tetrapeptidylaminopeptidase (PTP-SM) das Entfernen eines N-terminalen FRAP-Tetrapeptids, wohingegen die genaue Funktion dieses letzten Prozessierungsschritts noch nicht geklärt ist. Vermutet wurde bereits eine vorhergehende räumliche Lokalisation der bereits vollständig aktiven TGase über Salzbrücken (Pasternack *et al.*, 1998; Zotzel *et al.*, 2003a, 2003b). Zum Zeitpunkt dieser Arbeit waren die Gene und daraus abgeleitet die Primärstrukturen der TGase sowie der PTP-SM bereits vollständig aufgeklärt (Kanaji *et al.*, 1993; Pasternack *et al.*, 1998; Umezawa *et al.*, 2004). Von TAMEP war hingegen nur ein N-terminales Peptid bekannt, weswegen im Folgenden deren vollständige Sequenz über einen lokalen Datenbankabgleich der Genomdaten von *S. mobaraensis* mit dem genannten N-terminalen Peptid sowie der Sequenz der homologen Metalloprotease Griselysin von *S. griseus subsp. griseus* NBRC 13350 (B1W035; Ohnishi *et al.*, 2008) identifiziert und analysiert wurde.

Bei den Untersuchungen dieser Arbeit stellte sich heraus, dass das Genom von *S. mobaraensis* drei Gene enthält, deren Transkriptionsprodukte für die Translation von TAMEP infrage kommen, jedoch zeigte nur eines der mutmaßlichen Proteine das bereits zuvor bestimmte N-terminale Peptid (Abb. 67). Aus diesem Grund wurden die beiden anderen Analoga nachfolgend als *Streptomyces mobaraensis* Metalloprotease I und II (SmMPI und II) bezeichnet. Ebenso fiel auf, dass TAMEP nach der Biosynthese am Ribosom ca. 40% länger zu sein schien als seine beiden Analoga. Diese größere Masse ist jedoch vollständig auf einen C-terminalen Überhang von ca. 200 aa Länge zurückzuführen. Innerhalb der verbleibenden Bereiche weisen alle drei Proteine eine Identität von ca. 45% auf (Abb. 67).

Im C-terminalen Überhang befindet sich eine sog. P-Domäne (Abb. 69), welche für die Spaltung von Propeptiden durch Enzyme der Familie der Proprotein-Convertasen (PC) verantwortlich ist (Gluschankof und Fuller, 1994; Zhou *et al.*, 1998). Ebenso ist bei TAMEP das innerhalb der P-Domäne

hochkonservierte Arg-Gly-Asp-Motiv vorhanden, welches bei PC sowohl für die Autoprozessierung der Enzyme als auch für die korrekte Zielsteuerung verantwortlich ist (Lusson *et al.*, 1997; Rovere *et al.*, 1999). Diese Beobachtungen sowie die Funktion der TAMEP in der TGase-Prozessierung unterstützen die bereits von Zotzel geäußerte Mutmaßung, dass es sich bei TAMEP eher um ein Mitglied der Proprotein-Convertasen als um eine klassische Metalloprotease handelt (Zotzel, 2002). Welche Funktion die beiden anderen SmMP innerhalb des Lebenszyklus von *S. mobaraensis* besitzen, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

TAMEP lassen sich nach einem Abgleich der Aminosäuresequenz und anschließender Domänenzuordnung nach Marchler-Bauer *et al.* (2011) neben dem Signalpeptid nur drei Domänen zuordnen (Abb. 69, Abb. 82), die bereits genannte C-terminale P-Domäne, eine zentrale M4-Metalloproteasedomäne sowie ein sog. Fungalysin/Thermolysin-Propeptidmotiv zwischen Asp100 und Lys139 (Nummerierung vor Abspaltung des Signalpeptids). Daher sollte das Enzym als inaktives Zymogen nach dem Durchtritt durch die Plasmamembran verbleiben.

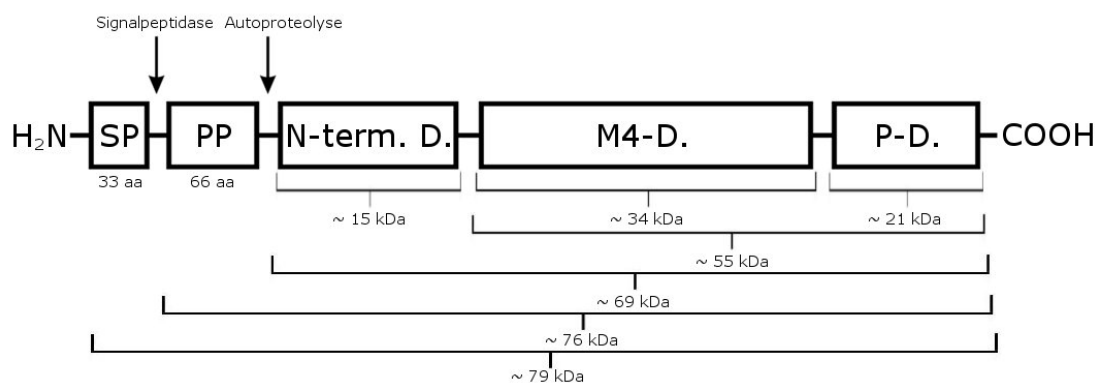


Abb. 82: Schematische Darstellung der Transglutaminase-aktivierenden Metalloprotease von *S. mobaraensis*: Dargestellt sind die einzelnen Domänen der TAMEP nach Zuordnung durch Marchler-Bauer *et al.*, 2011 sowie das N-terminale Signalpeptid (SP). Zwischen dem Signalpeptid sowie der N-terminalen Domäne, in der sich das Fungalysin/Thermolysin-Propeptid befindet, liegt ein nicht näher charakterisiertes Propeptid (PP). C-seitig der N-terminalen Domäne beginnt die M4-Domäne, welche N-seitig von dem von Zotzel *et al.* bestimmten Peptid begrenzt wird (2003a). Den C-Terminus des Proteins bildet die P-Domäne, in deren Sequenz sich das hochkonservierte Arg-Gly-Asp-Motiv befindet. Die Signalpeptidasebindestelle sowie Autoproteolyseposition sind hypothetischer Natur.

Der Sequenzabgleich zeigte zweifelsfrei, dass das von Zotzel *et al.* bestimmte N-terminale Peptid den Start der M4-Domäne markiert (Zotzel *et al.*, 2003a). Damit hätte das „reife“ Protein eine Länge von 531 aa und eine Molmasse von 55 372.18 Da und entspräche somit dem Vorläuferprotein ohne N-terminale Domäne. Nach Standarddenaturierung mit SDS bestimmte Zotzel *via* Elektrophorese eine apparente Molmasse von ca. 39 kDa. Geschickte Handhabung des Proteins in Vorbereitung der Elektrophorese (Inkubation mit heißem Auftragspuffer, Versetzen des Auftragspuffers mit Harnstoff oder EDTA) ergab eine apparente Molmasse von ca. 68 kDa. Hieraus wurde geschlossen, dass die Autoproteolyse des Enzyms durch heißen Auftragspuffer und Additive verhindert oder verlangsamt wurde (Zotzel, 2002). Ein Vergleich der apparenten und der kalkulierten Molmassen bestätigte diese Vermutung. Die theoretische Molmasse des Proteins mit N-terminaler Domäne (Abb. 82) beträgt 68 872.55 Da. Kommt es im Rahmen der Prozessierung und/oder der Denaturierung im Vorfeld der SDS-PAGE zur Abspaltung der N-terminalen Domäne sowie zum Verlust des C-terminalen Überhangs, der die TAMEP von den beiden SmMP oder auch Thermolysin (P00800) unterscheidet und die P-Domäne beinhaltet (Abb. 67), so sinkt die theoretische Molmasse auf 34 209.89 Da. Die Untersuchungen von Zotzel mit Harnstoff im Elektrophorese-Auftragspuffer wiesen neben den Banden bei 68 kDa und 39 kDa Proteine mit den apparenten Molmassen von 15 kDa und 21 kDa nach (Zotzel, 2002). Diese entsprechen fast exakt den theoretischen Molmassen der N- (14 529.62 Da) und C-terminalen Domänen (21 180.31 Da). Anhand dieser Ergebnisse ließ sich der experimentell abgeleitete Prozessierungsverlauf der TAMEP bestätigen.

Dass Zotzel nie eine Molmasse von ca. 55 kDa nachweisen konnte, was dem reifen Enzym nach Abspaltung der N-terminalen Domäne, welche das Fungolysin/Thermolysin-Propeptidmotivs enthält, mit C-terminalen Überhang entspräche, und gleichzeitig eine proteolytische Aktivität nur auf Höhe der 68 kDa-Bande nachgewiesen werden konnte, lässt darauf schließen, dass die Prozessierung von TAMEP einer Regulation unterliegt. Es scheint so, als würde nach autoproteolytischer Abspaltung der N-terminalen Domäne umgehend in

einem zweiten Schritt die Abspaltung des C-terminalen Überhangs erfolgen, und in der Folge das Enzym sämtliche proteolytische Aktivität verlieren. Somit scheint das in Abb. 69 dargestellte Fungalysin/Thermolysin-Propeptid in der N-terminalen Domäne im Gegensatz zu Thermolysin keine inaktivierende Wirkung auf TAMEP zu besitzen. Eher scheint es so, als würde sich in dem Bereich zwischen Signalpeptid und der N-terminalen Domäne das eigentliche TAMEP-inhibierende Propeptid befinden, welches zur Aktivierung des Enzyms autokatalytisch entfernt werden muss.

4.6.2. Signalpeptidasen

Alle Proteine, die im Rahmen der Transglutminasenforschung der AG Fuchsbauer bekannt wurden, wurden aus der Kulturbrühe von *S. mobaraensis* isoliert. Um einen Transport über die Plasmamembran und nachfolgend eine potenzielle Sekretion zu ermöglichen, müssen die Proteine ein entsprechendes Signalpeptid besitzen. Dieses wird nach dem Durchtritt durch die Plasmamembran von Enzymen der Familie der Signalpeptidasen proteolytisch entfernt. Da bei jedem der in dieser Arbeit untersuchten Proteine, einschließlich der hyphenhüllenbildenden Chapline und Rodline, ein N-terminales Signalpeptid nachgewiesen werden konnte, sollte abschließend die Anzahl und Sequenz der entsprechenden Signalpeptidasen bestimmt werden.

Hierbei zeigte sich, dass das Genom von *S. mobaraensis* fünf Gene enthält, die für ubiquitär vorkommende Klasse 1-Signalpeptidasen (Sip) codieren. *E. coli* besitzt z.B. nur ein Gen für Klasse 1-Sip (Dalbey und Wickner, 1985; Tschantz *et al.*, 1993), die meisten Eukaryonten oder auch *Staphylococcus aureus* zwei (Cregg *et al.*, 1996; Dalbey *et al.*, 1997) und das Gram-positive *Deinococcus radiodurans* drei entsprechende Enzyme (White *et al.*, 1999). Einige Organismen besitzen jedoch auch mehr Gene, die für Klasse 1-Sip codieren. So finden sich auf dem Genom von *B. subtilis* sogar sieben Vertreter (van Dijl *et al.*, 1995; Tjalsma *et al.*, 1998).

Für andere Streptomyceten wie *S. lividans* wurden bisher vier entsprechende Gene nachgewiesen (Parro *et al.*, 1999). Diese sind in einem

Cluster angeordnet. Ein ähnliches Bild zeigte sich für die Verteilung der Sip-codierenden Gene im Genom von *S. mobaraensis*. Hier sind vier der fünf Gene direkt aufeinander folgend organisiert, während das verbleibende Gen auf einem entfernten Abschnitt des Genoms zu finden ist (Abb. 74). Während Sip-Gencluster auch bei *S. coelicolor* und *S. venezuelae* auftreten (Bentley *et al.*, 2002; Pullan *et al.*, 2011), sind die Gene von Gram-positivem *B. subtilis* über das gesamte Genom verteilt (Kunst *et al.*, 1997). Dies deutet darauf hin, dass eine derartige Organisation der Gene spezifisch für die Gattung *Streptomyces* sein könnte.

Alle fünf putativen Klasse 1-Sip von *S. mobaraensis* weisen die von van Dijk *et al.* beschriebene typische Architektur aus fünf Domänen auf (Abb. 76; van Dijk *et al.*, 1992, 1995), obwohl sie sich in Länge und pI deutlich unterscheiden (Tab. 55). Teilweise ist die Sip-Größe der von *B. subtilis* ähnlich (z.B. SipS: 184 aa), teilweise aber auch der von Gram-negativem *E. coli* (LepB: 323 aa). Weiterhin weisen drei der fünf Proteine neben der N-terminalen eine zusätzliche C-terminale Transmembrandomäne auf, die den Unterschied zwischen den einzelnen Enzymen aufzeigt. Für die vier Klasse 1-Sip von *S. lividans* konnte gezeigt werden, dass es nicht möglich war, mit einem polyklonalen Antikörper gegen einen einzelnen Sip ausschließlich das Antigen zu markieren. Kreuzreaktivität wurde mindestens noch zu einer anderen Signalpeptidase gefunden. Dies deutet darauf hin, dass die verschiedenen Enzyme trotz Unterschiede in der Primärstruktur homologe Sekundärelemente aufweisen. Im Rahmen derselben Arbeit wurde die Spezifität der einzelnen Sip untersucht, jedoch mit einem Proprotein von *B. subtilis* (Geukens *et al.*, 2001). Deshalb ist bisher keine Präferenz einer Sip für ein bestimmtes Substrat bekannt.

Ebenso konnte gezeigt werden, dass ein einzelnes Klasse 1-Sip für das Überleben eines Bakteriums nicht entscheidend ist, wenn, wie bei *S. lividans* oder *B. subtilis*, mehrere Sip produziert werden können. Zwar zeigten Deletionsmutanten modifizierte Sekretionsmuster, was unterschiedliche Spezifität anzeigte, jedoch konnte aus dem Überleben der Zelle geschlossen werden, dass die Enzyme sich gegenseitig ersetzen können (Tjalsma *et al.*, 1997, 1998; Palacin *et al.*, 2002). Innerhalb eines Organismus lassen sich die

Klasse 1-Sip in zwei Gruppen unterteilen, in solche, deren Gendeletion erheblichen Einfluss auf die Proteinprozessierung hat (*major* Sip), und andere, nach deren Gendeletion das Sekretom dem Wildtyp-Profil ähnelt (*minor* Sip). So zeigte sich, dass SipY von *S. lividans* eine *major* Sip ist, während die verbleibenden drei Enzyme zu den *minor* Sip zu zählen sind (Palacin *et al.*, 2002). Diese sind jedoch bei Ausfall der *major* Sip in der Lage, diese zu ersetzen und so das Überleben der Zelle zu gewährleisten (Escutia *et al.*, 2006). Ob und welche der fünf bei *S. mobaraensis* gefundenen putativen Klasse 1-Sip zu welcher Klasse gezählt werden muss, und ob es möglich ist, einzelnen Enzymen zumindest favorisierte Substrate zuzuordnen, müssen Folgeuntersuchungen zeigen.

Neben den fünf beschriebenen Klasse 1-Sip konnte über Genomanalyse ein Gen analysiert werden, welches für eine Klasse 2-Signalpeptidase, den sog. Prolipoproteinsignalpeptidasen codiert (nachfolgend als Lsp1 bezeichnet; Abb. 77). Vergleichende Datenbankanalysen der vollständigen Aminosäuresequenz des *Streptomyces*-Papaininhibitors zeigten Homologien zu putativen Lipoproteinen (Tab. 45). Klasse 2-Sip sind P1'-Proteasen, erkennen ein hochkonserviertes Leu-(Ala,Ser,Thr)-(Gly,Ala)-(S-Diacylglyceryl)-Cys-Motiv und hydrolysieren die N-seitige Peptidbindung des Cysteins (Inouye *et al.*, 1983a, 1983b; Paetzel *et al.*, 2002). Dieses Motiv ist in der Sequenz von SPI jedoch nicht vorhanden (Abb. 22), weswegen ausgeschlossen werden konnte, dass es sich dabei tatsächlich um ein plasmamembranverankertes Protein handelt.

Ebenso wie Klasse 1-Sip weisen auch die Mitglieder der Klasse 2-Sip eine konservierte Architektur auf, welche ebenfalls aus fünf konservierten Domänen aufgebaut ist. Diese zeigen jedoch im Gegensatz zu den Vertretern der Klasse 1-Sip insgesamt vier Transmembrandomänen (Paetzel *et al.*, 2002). Auffällig ist, dass die erste dieser vier Domänen der Lsp1 von *S. mobaraensis* vollständig fehlt (rot in Abb. 77). Tjalsma *et al.* beschrieben den hier befindlichen Aspartylrest als essenziell. D14A-Mutanten von LspA aus *B. subtilis* führten zum vollständigen Verlust der Aktivität, verursacht durch strukturelle Defekte (Tjalsma *et al.*, 1999). LspA von *S. coelicolor* A3(2) besitzt diesen Asp-Rest (Q9S2X7) und auch eine BLAST-Analyse mit der LspA-

Sequenz gegen eine *Streptomyces*-Datenbank ergab kein Analogon, das den entsprechenden Bereich nicht aufwies. Da jedoch *lsp1* das einzige Gen einer Lsp ist, das auf dem Genom von *S. mobaraensis* ausgemacht werden konnte, und die Funktion des Translationsprodukts wohl ähnlich wie bei einfach vorhandenen Klasse 1-Sip essenziell für das Überleben des Organismus ist, ist es sehr wahrscheinlich, dass das Enzym trotz fehlendem Aspartat aktiv ist. Möglicherweise ist Lsp1 ein weiteres Enzym mit ungewöhnlicher Aktivität, das *S. mobaraensis* von anderen Streptomyceten mit sequenziertem Genom unterscheidet. Dies muss jedoch in Folgeuntersuchungen abschließend bestimmt werden.

5. Literaturverzeichnis

- Adekoya, O. A. und Sylte, I. (2009)** The thermolysin family (M4) of enzymes: therapeutic and biotechnological potential. *Chem. Biol. Drug Des.* **73**, 7-16
- Akanuma, G., Hara, H., Ohnishi, Y. und Horinouchi, S. (2009)** Dynamic changes in the extracellular proteome caused by absence of a pleiotropic regulator AdpA in *Streptomyces griseus*. *Mol. Microbiol.* **73**, 898-912
- Anantharaman, V. und Aravind, L. (2003)** Evolutionary history, structural features and biochemical diversity of the NlpC/P60 superfamily of enzymes. *Genome Biol.* **4**, R11
- Ando, H., Adachi, M., Umeda, K., Matsuura, A., Nonaka, M., Uchio, R., Tanaka, H. und Motoki, M. (1989)** Purification and Characteristics of a Novel Transglutaminase derived from microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* **53**, 2613-2617
- Angert, E. R. (2005)** Alternatives to binary fission in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 214-224
- Anné, J. und Van Mellaert, L. (1993)** *Streptomyces lividans* as host for heterologous protein production. *FEMS Microbiol. Lett.* **114**, 121-128
- Anson, M. L. (1938)** The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with Hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* **22**, 79-89
- Barbe, V., Bouzon, M., Mangelot, S., Badet, B., Poulain, J., Segurens, B., Vallenet, D., Marliere, P. und Weissenbach, J. (2011)** Complete genome sequence of *Streptomyces cattleya* NRRL 8057, a producer of antibiotics and fluorometabolites. *J. Bacteriol.* **193**, 5055-5056
- Barkocy-Gallagher, G. A. und Bassford, P. J., Jr. (1992)** Synthesis of precursor maltose-binding protein with proline in the +1 position of the cleavage site interferes with the activity of *Escherichia coli* signal peptidase I *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **267**, 1231-1238
- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdano-Tarraga, A.-M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., H., K., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., A., C., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howard, S., Hunag, C.-H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neal, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M.-A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., G., B. B., Parkhill, J. und Hopwood, D. A. (2002)** Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature.* **417**, 141-147
- Berdy, J. (1980)** Recent advances in and prospects of antibiotic research. *Process Biochem.* **15**, 28-35
- Bernfeld, P. (1955)** Amylases, alpha and beta. *Meth. Enzymol.* **1**, 149 -158
- Bessette, P. H., Aslund, F., Beckwith, J. und Georgiou, G. (1999)** Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **96**, 13703-13708
- Bibb, M. J. (2005)** Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr Opin Microbiol.* **8**, 208-215
- Bibb, M. J., Molle, V. und Buttner, M. J. (2000)** Sigma-BldN, an extracytoplasmic function RNA polymerase sigma factor required for aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **182**, 4606-4616
- Bibb, M. J., Domonkos, A., Chandra, G. und Buttner, M. J. (2012)** Expression of the chaplin and rodlin hydrophobic sheath proteins in *Streptomyces venezuelae* is controlled by sigma(BldN) and a cognate anti-sigma factor, RsbN. *Mol. Microbiol.* **84**, 1033-1049
- Bignell, D. R. D., Seipke, R. F., Huguet-Tapai, J. C., Chambers, A. H., Parry, R. J. und Loria, R. (2010)** *Streptomyces scabies* 87-22 Contains a Coronafacic Acid-Like Biosynthetic Cluster That Contributes to Plant-Microbe Interactions. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **23**, 161-175

- Birch, A., Häusler, A. und Hütter, R. (1990) Genome rearrangement and genetic instability in *Streptomyces* spp. *J. Bacteriol.* **172**, 4138-4142
- Blattner, F. R., Plunkett III, G., Bloch, C. A., Perna, N., T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. und Shao, Y. (1997) The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*. **277**, 1453-1462
- Bleischwitz, M., Albert, M., Fuchsbaauer, H. L. und Kaldenhoff, R. (2010) Significance of Cuscutain, a cysteine protease from *Cuscuta reflexa*, in host-parasite interactions. *BMC Plant. Biol.* **10**, 227
- Bloomfield, B. J. und Alexander, M. (1967) Melanins and resistance of fungi to lysis. *J. Bacteriol.* **93**, 1276-1280
- Blum, H., Beier, H. und Gross, H. J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. **8**, 93-99
- Borza, D. B., Tatum, F. M. und Morgan, W. T. (1996) Domain structure and conformation of histidine-proline-rich glycoprotein. *Biochemistry*. **35**, 1925-1934
- Brana, A. F., Mendez, C., Diaz, L. A., Manzanal, M. B. und Hardisson, C. (1986) Glycogen and trehalose accumulation during colony development in *Streptomyces antibioticus*. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 1319-1326
- Braun, P. und Tommassen, J. (1998) Function of bacterial propeptides. *Trends Microbiol.* **6**, 6-8
- Bruton, C. J., Plaskitt, K. A. und Chater, K. F. (1995) Tissue-specific glycogen branching isoenzymes in a multicellular prokaryote *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* **18**, 89-99
- Candi, E., Melino, G., Mei, G., Tarcsa, E., Chung, S. I., Marekov, L. N. und Steinert, P. M. (1995) Biochemical, structural, and transglutaminase substrate properties of human loricrin, the major epidermal cornified cell envelope protein. *J. Biol. Chem.* **270**, 26382-26390
- Capstick, D. S., Willey, J. M., Buttner, M. J. und Elliot, M. A. (2007) SapB and the chaplins: connections between morphogenetic proteins in *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* **64**, 602-613
- Capstick, D. S., Jomaa, A., Hanke, C., Ortega, J. und Elliot, M. A. (2011) Dual amyloid domains promote differential functioning of the chaplin proteins during *Streptomyces* aerial morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **108**, 9821-9826
- Carrio, M. M., Corchero, J. L. und Villaverde, A. (1998) Dynamics of *in vivo* protein aggregation: building inclusion bodies in recombinant bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **169**, 9-15
- Carrio, M. M., Cubarsi, R. und Villaverde, A. (2000) Fine architecture of bacterial inclusion bodies. *FEBS Lett.* **471**, 7-11
- Castillo, R. M., Mizuguchi, K., Dhanaraj, V., Albert, A., Blundell, T. L. und Murzin, A. G. (1999) A six-stranded double-psi beta barrel is shared by several protein superfamilies. *Structure*. **7**, 227-236
- Chaconas, G. und Chen, C. W. (2005). Linear chromosomes in bacteria: no longer going around in circles. In: The Bacterial chromosome, N.P. Higgins, ed, Washington, D.C. . American Society for Microbiology Press.
- Champness, W. C. (1988) New loci required for *Streptomyces coelicolor* morphological and physiological differentiation. *J. Bacteriol.* **170**, 1168-1174
- Chang, N. S., Leu, R. W., Rummage, J. A., Anderson, J. K. und Mole, J. E. (1992) Regulation of macrophage Fc receptor expression and phagocytosis by histidine-rich glycoprotein. *Immunology*. **77**, 532-538
- Chater, K. (1998) Taking a genetic scalpel to the *Streptomyces* colony. *Microbiology*. **144**, 1465-1478
- Chater, K., Biro, S., Palmer, T. und Schrempf, H. (2010a) The evolution of *Streptomyces* has involved an amazingly complex extracellular biology. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 171-198

- Chater, K. F. (1993)** Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**, 685-713
- Chater, K. F. (2011)**. Diffentiation in *Streptomyces*: the Properties and Programming of Diverse Cell Types. In: *Streptomyces*. Molecular Biology and Biotechnology, P. Dyson, ed, Norfolk, UK: Caister Academic Press, pp. 43-86.
- Chater, K. F. und Merrick, M. J. (1979)**. *Streptomyces*. In: Developmental Biology of Prokaryotes, J.H. Parish, ed, Oxford: Blackwell, pp. 93-114.
- Chater, K. F. und Chandra, G. (2006)** The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**, 651-672
- Chater, K. F. und Chandra, G. (2008)** The use of the rare UUA codon to define "expression space" for genes involved in secondary metabolism, development and environmental adaptation in *streptomyces*. *J. Microbiol.* **46**, 1-11
- Chater, K. F., Biro, S., Lee, K. J., Palmer, T. und Schrempf, H. (2010b)** The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**, 171-198
- Chater, K. F., Bruton, C. J., Plaskitt, K. A., Buttner, M. J., Mendez, C. und Helmann, J. D. (1989)** The developmental fate of *S. coelicolor* hyphae depends upon a gene product homologous with the motility sigma factor of *B. subtilis*. *Cell.* **59**, 133-143
- Christensen, B. M., Sorsensen, E. S., Hojrup, P., Petersen, T. E. und Rasmussen, L. K. (1996)** Localization of Potential Transglutaminase Cross-Linking Sites in Bovine Caseins. *J. Agric. Food Chem.* 1943-1947
- Chung, S. I. (1972)** Comparative Studies on Tissue Transglutaminase and Factor XIII. *Ann. NY Acad. Sci.* **202**, 240-255
- Claessen, D., Wösten, H. A., van Keulen, G., Faber, O. G., Alves, A. M., Meijer, W. G. und Dijkhuizen, L. (2002)** Two novel homologous proteins of *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces lividans* are involved in the formation of the rodlet layer and mediate attachment to a hydrophobic surface. *Mol. Microbiol.* **44**, 1483-1492
- Claessen, D., Rink, R., de Jong, W., Siebring, J., de Vreugd, P., Boersma, F. G., Dijkhuizen, L. und Wösten, H. A. (2003)** A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils. *Genes Dev.* **17**, 1714-1726
- Claessen, D., Stokroos, I., Deelstra, H. J., Penninga, N. A., Bormann, C., Salas, J. A., Dijkhuizen, L. und Wösten, H. A. (2004)** The formation of the rodlet layer of streptomycetes is the result of the interplay between rodlines and chaplins. *Mol. Microbiol.* **53**, 433-443
- Cregg, K. M., Wilding, I. und Black, M. T. (1996)** Molecular cloning and expression of the *spsB* gene encoding an essential type I signal peptidase from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **178**, 5712-5718
- Cubarsi, R., Carrio, M. M. und Villaverde, A. (2001)** In situ proteolytic digestion of inclusion body polypeptides occurs as a cascade process. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282**, 436-441
- da Silva, A. C., Ferro, J. A., Reinach, F. C., Farah, C. S., Furlan, L. R., Quaggio, R. B., Monteiro-Vitorello, C. B., Van Sluys, M. A., Almeida, N. F., Alves, L. M., do Amaral, A. M., Bertolini, M. C., Camargo, L. E., Camarotte, G., Cannavan, F., Cardozo, J., Chambergo, F., Ciapina, L. P., Cicarelli, R. M., Coutinho, L. L., Cursino-Santos, J. R., El-Dorry, H., Faria, J. B., Ferreira, A. J., Ferreira, R. C., Ferro, M. I., Formighieri, E. F., Franco, M. C., Greggio, C. C., Gruber, A., Katsuyama, A. M., Kishi, L. T., Leite, R. P., Lemos, E. G., Lemos, M. V., Locali, E. C., Machado, M. A., Madeira, A. M., Martinez-Rossi, N. M., Martins, E. C., Meidanis, J., Menck, C. F., Miyaki, C. Y., Moon, D. H., Moreira, L. M., Novo, M. T., Okura, V. K., Oliveira, M. C., Oliveira, V. R., Pereira, H. A., Rossi, A., Sena, J. A., Silva, C., de Souza, R. F., Spinola, L. A., Takita, M. A., Tamura, R. E., Teixeira, E. C., Tezza, R. I., Trindade dos Santos, M., Truffi, D., Tsai, S. M., White, F. F., Setubal, J. C. und Kitajima, J. P. (2002)** Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature.* **417**, 459-463

- Dalbey, R. E. und Wickner, W. (1985) Leader peptidase catalyzes the release of exported proteins from the outer surface of the *Escherichia coli* plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **260**, 15925-15931
- Dalbey, R. E., Kuhn, A. und Wickner, W. (1987) The internal signal sequence of *Escherichia coli* leader peptidase is necessary, but not sufficient, for its rapid membrane assembly. *J. Biol. Chem.* **262**, 13241-13245
- Dalbey, R. E., Lively, M. O., Bron, S. und van Dijk, J. M. (1997) The chemistry and enzymology of the type I signal peptidases. *Protein Sci.* **6**, 1129-1138
- de Jong, W., Wösten, H. A., Dijkhuizen, L. und Claessen, D. (2009) Attachment of *Streptomyces coelicolor* is mediated by amyloid fimbriae that are anchored to the cell surface via cellulose. *Mol. Microbiol.* **73**, 1128-1140
- Del Sol, R., Armstrong, I., Wright, C. und Dyson, P. (2007) Characterization of changes to the cell surface during the life cycle of *Streptomyces coelicolor*: atomic force microscopy of living cells. *J. Bacteriol.* **189**, 2219-2225
- Di Berardo, C., Capstick, D. S., Bibb, M. J., Findlay, K. C., Buttner, M. J. und Elliot, M. A. (2008) Function and redundancy of the chaplin cell surface proteins in aerial hypha formation, rodlet assembly, and viability in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **190**, 5879-5889
- Duong, A., Capstick, D. S., Di Berardo, C., Findlay, K. C., Hesketh, A., Hong, H. J. und Elliot, M. A. (2012) Aerial development in *Streptomyces coelicolor* requires sortase activity. *Mol. Microbiol.* **83**, 992-1005
- Eckhardt, T., Strickler, J. E., Gorniak, L., Burnett, W. V. und Fare, L. R. (1987) Characterization of the promoter, signal sequence, and amino terminus of a secreted beta-galactosidase from *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* **169**, 4249-4256
- Elliot, M. A. und Talbot, N. J. (2004) Building filaments in the air: aerial morphogenesis in bacteria and fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**, 594-601
- Elliot, M. A., Buttner, M. J. und Nordwell, J. R. (2008). Multicellular development in *Streptomyces*. In: *Myxobacteria: Multicellularity and Differentiation*, D.E. Whitworth, ed, Washington D.C.: American Society of Microbiology, pp. 419-438.
- Elliot, M. A., Karoonuthaisiri, N., Huang, J., Bibb, M. J., Cohen, S. N., Kao, C. M. und Buttner, M. J. (2003) The chaplins: a family of hydrophobic cell-surface proteins involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*. *Genes Dev.* **17**, 1727-1740
- Enquist, L. W. und Bradley, S. G. (1971) Characterization of deoxyribonucleic acid from *Streptomyces venezuelae* species. *Dev. Ind. Microbiol.* **12**, 225-236
- Ensign, J. C. (1978). Formation, properties, and germination of actinomycete spores.
- Escutia, M. R., Val, G., Palacin, A., Geukens, N., Anne, J. und Mellado, R. P. (2006) Compensatory effect of the minor *Streptomyces lividans* type I signal peptidases on the SipY major signal peptidase deficiency as determined by extracellular proteome analysis. *Proteomics*. **6**, 4137-4146
- Fernandez, M. und Sanchez, J. (2002) Nuclease activities and cell death processes associated with the development of surface cultures of *Streptomyces antibioticus* ETH 7451. *Microbiology*. **148**, 405-412
- Fischer, B., Sumner, I. und Goodenough, P. (1993) Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biotechnol. Bioeng.* **41**, 3-13
- Fischetti, V. A. (2000). Surface proteins of Gram-positive bacteria. In: *Gram-positive pathogens*, V.A. Fischetti, R.P. Novick, J.J. Ferretti, D.A. Portnoy, and J.I. Rood, eds, Washington, DC.: ASM Press, pp. 11-24.
- Fleischmann, R. D., Alland, D., Eisen, J. A., Carpenter, L., White, O., Peterson, J., DeBoy, R., Dodson, R., Gwinn, M., Haft, D., Hickey, E., Kolonay, J. F., Nelson, W. C., Umayam, L. A., Ermolaeva, M., Salzberg, S. L., Delcher, A., Utterback, T., Weidman, J., Khouri, H., Gill, J., Mikula, A., Bishai, W., Jacobs, W. R., Venter, J. C.

- und Fraser, C. M. (2002) Whole-Genome Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical and Laboratory Strains. *J. Bacteriol.* **184**, 5479-5490
- Folk, J. E. und Finlayson, J. S. (1977) The epsilon-(gamma-glutamyl)lysine crosslink and the catalytic role of Transglutaminases. *Adv. Protein Chem.* **31**, 1-133
- Fowler-Goldsworthy, K., Gust, B., Mouz, S., Chandra, G., Findlay, K. C. und Chater, K. F. (2011) The actinobacteria-specific gene wblA controls major developmental transitions in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology.* **157**, 1312-1328
- Froger, A. und Hall, J. E. (2007) Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *J. Vis. Exp.* 253
- Gallegos, M.-T., Schleif, R., Bairoch, A., Hofmann, K. und Ramos, J. L. (1997) Arac-XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 393-410
- Garcia Diaz, L. A., Salas, J. A. und Hardisson, C. (1983) Intracellular pool of *Streptomyces* spores amino acids, nucleosides, adenine nucleotide levels and energy charge. *FEMS Microbiol. Lett.* **19**, 215-219
- Garcia, M. (1995) A membrane-like structure envelopes substrate mycelium during colony development in *Streptomyces*. *FEMS Microbiol. Lett.* **131**, 107-111
- Gebauer, E. (2010). Über die Stabilität von Transglutaminase aus *Streptomyces mobaraensis*. Diplomarbeit, Hochschule Darmstadt.
- Georgelis, N., Tabuchi, A., Nikolaidis, N. und Cosgrove, D. J. (2011) Structure-function analysis of the bacterial expansin EXLX1. *J. Biol. Chem.* **286**, 16814-16823
- Georgiou, G. und Valax, P. (1996) Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**, 190-197
- Gerber, N. N. und Lechevalier, H. A. (1965) Geosmin an Earthy-Smelling Substance Isolated from Actinomycetes. *Appl. Microbiol.* **13**, 935-938
- Geukens, N., Parro, V., Rivas, L. A., Mellado, R. P. und Anne, J. (2001) Functional analysis of the *Streptomyces lividans* type I signal peptidases. *Arch. Microbiol.* **176**, 377-380
- Glauert, A. M. und Hopwood, D. A. (1961) The fine structure of *Streptomyces violaceoruber* (S. coelicolor). III. The walls of the mycelium and spores. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **10**, 505-516
- Gluschankof, P. und Fuller, R. S. (1994) A C-terminal domain conserved in precursor processing proteases is required for intramolecular N-terminal maturation of pro-Kex2 protease. *EMBO J.* **13**, 2280-2288
- Greenberg, C. S., Birckbichler, P. J. und Rice, R. H. (1991) Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *FASEB J.* **5**, 3071-3077
- Hain, T., Ward-Rainey, N., Kroppenstedt, R. M., Stackebrandt, E. und Rainey, F. A. (1997) Discrimination of *Streptomyces albidoflavus* strains based on the size and number of 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 202-206
- Han, X., Li, M., Ding, Z., Zhao, J., Ji, K., Wen, M. und Lu, T. (2012) Genome sequence of *Streptomyces auratus* strain AGR0001, a phoslactomycin-producing actinomycete. *J. Bacteriol.* **194**, 5472-5473
- Henderson, I. C. (1993) Recent advances in the usage of mitomycin. Proceedings of a symposium. Hawaii, March 21-24, 1991. *Oncology.* **1**, 1-83
- Hiraga, K., Suzuki, T. und Oda, K. (2000) A novel double-headed proteinaceous inhibitor for metalloproteinase and serine proteinase. *J. Biol. Chem.* **275**, 25173-25179
- Hiraga, K., Seeram, S. S., Tate, S., Tanaka, N., Kainosho, M. und Oda, K. (1999) Mutational analysis of the reactive site loop of *Streptomyces* metalloproteinase inhibitor, SMPI. *J. Biochem.* **125**, 202-209
- Hirano, S., Kato, J. Y., Ohnishi, Y. und Horinouchi, S. (2006) Control of the *Streptomyces* Subtilisin inhibitor gene by AdpA in the A-factor regulatory cascade in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **188**, 6207-6216

- Hirono, S., Akagawa, H., Mitsui, Y. und Iitaka, Y. (1984) Crystal structure at 2.6 Å resolution of the complex of subtilisin BPN' with *Streptomyces* subtilisin inhibitor. *J. Mol. Biol.* **178**, 389-414
- Hirsch, C. F. und Ensign, J. C. (1978) Some properties of *Streptomyces viridochromogenes* spores. *J. Bacteriol.* **134**, 1056-1063
- Hohenadl, C., Mann, K., Mayer, U., Timpl, R., Paulsson, M. und Aeschlimann, D. (1995) Two adjacent N-terminal glutamines of BM-40 (osteonectin, SPARC) act as amine acceptor sites in transglutaminase C-catalyzed modification. *J. Biol. Chem.* **270**, 23415-23420
- Hopwood, D. A. (2007). *Streptomyces* in Nature and Medicine: The Antibiotic makers. New York. Oxford University Press.
- Horinouchi, S. (2007) Mining and Polishing of the Treasure Trove in the Bacterial Genus *Streptomyces*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 283-299
- Hotson, I. K. (1982) The avermectins: A new family of antiparasitic agents. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* **53**, 87-90
- Hu, Y., Webb, E., Singh, J., Morgan, B. A., Gainor, J. A., Gordon, T. D. und Siahaan, T. J. (2002) Rapid determination of substrate specificity of *Clostridium histolyticum* beta-collagenase using an immobilized peptide library. *J. Biol. Chem.* **277**, 8366-8371
- Hubbard, T. J., Ailey, B., Brenner, S. E., Murzin, A. G. und Chothia, C. (1999) SCOP: a Structural Classification of Proteins database. *Nucleic Acids Res.* **27**, 254-256
- Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M. und Omura, S. (2003) Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat. Biotechnol.* **21**, 526-531
- Ikenaka, T., Odani, S., Sakai, M., Nabeshima, Y., Sato, S. und Murao, S. (1974) Amino acid sequence of an alkaline proteinase inhibitor (*Streptomyces* subtilisin inhibitor) from *Streptomyces albogriseolus* S-3253. *J. Biochem.* **76**, 1191-1209
- Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. **96**, 21-28
- Inouye, S., Hsu, C. P., Itakura, K. und Inouye, M. (1983a) Requirement for signal peptide cleavage of *Escherichia coli* prolipoprotein. *Science*. **221**, 59-61
- Inouye, S., Franceschini, T., Sato, M., Itakura, K. und Inouye, M. (1983b) Prolipoprotein signal peptidase of *Escherichia coli* requires a cysteine residue at the cleavage site. *EMBO J.* **2**, 87-91
- Kalakoutskii, L. V. und Agre, N. S. (1976) Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. *Bacteriol. Rev.* **40**, 469-524
- Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D., Bischoff, N., Bott, M., Burkovski, A., Dusch, N., Eggeling, L., Eikmanns, B. J., Gaigalat, L., Goesmann, A., Hartmann, M., Huthmacher, K., Krämer, R., Linke, B., McHardy, A. C., Meyer, F., Möckel, B., Pfefferle, W., Pühler, A., Rey, D. A., Rückert, C., Rupp, O., Sahm, H., Wendisch, V. F., Wiegräbe, I. und Tauch, A. (2003) The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J. Biotechnol.* **104**, 5-25
- Kaman, W. E., Hulst, A. G., van Alphen, P. T., Roffel, S., van der Schans, M. J., Merkel, T., van Belkum, A. und Bikker, F. J. (2011) Peptide-based fluorescence resonance energy transfer protease substrates for the detection and diagnosis of *Bacillus* species. *Anal. Chem.* **83**, 2511-2517
- Kaman, W. E., Galassi, F., de Soet, J. J., Bizzarro, S., Loos, B. G., Veerman, E. C., van Belkum, A., Hays, J. P. und Bikker, F. J. (2012) Highly specific protease-based approach for detection of *Porphyromonas gingivalis* in diagnosis of periodontitis. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 104-112

- Kanaji, T., Ozaki, H., Takao, T., Kawajiri, H., Ide, H., Motoki, M. und Shimonishi, Y. (1993) Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptovercillium* sp. strain s-8112. *J. Biol. Chem.* **268**, 11565-11572
- Kang, S. G. und Lee, K. J. (1997) Kinetic analysis of morphological differentiation and protease production in *Streptomyces albidoflavus* SMF301. *Microbiology.* **143**, 2709-2714
- Kashiwagi, T., Yokoyama, K., Ishikawa, K., Ono, K., Ejima, D., Matsui, H. und Suzuki, E. (2002) Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptovercillium mobaraense*. *J. Biol. Chem.* **277**, 44252-44260
- Kato, J. Y., Ohnishi, Y. und Horinouchi, S. (2005a) Autorepression of AdpA of the AraC/XylS family, a key transcriptional activator in the A-factor regulatory cascade in *Streptomyces griseus*. *J. Mol. Biol.* **350**, 12-26
- Kato, J. Y., Hirano, S., Ohnishi, Y. und Horinouchi, S. (2005b) The *Streptomyces* Subtilisin Inhibitor - SSI - Gene in *Streptomyces coelicolor*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 1624-1629
- Kato, J. y., Suzuki, A., Yamazaki, H., Ohnishi, Y. und Horinouchi, S. (2002) Control by A-Factor of a Metalloendopeptidase Gene Involved in Aerial Mycelium Formation in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **184**, 6016-6025
- Kato, J. Y., Chi, W. J., Ohnishi, Y., Hong, S. K. und Horinouchi, S. (2005c) Transcriptional control by A-factor of two trypsin genes in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **187**, 286-295
- Kelemen, G. H., Viollier, P. H., Tenor, J. L., Marri, L., Buttner, M. J. und Thompson, C. J. (2001) A connection between stress and development in the multicellular prokaryote *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* **40**, 804-814
- Kelley, L. A. und Sternberg, M. J. (2009) Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat. Protoc.* **4**, 363-371
- Kerff, F., Amoroso, A., Herman, R., Sauvage, E., Petrella, S., Filee, P., Charlier, P., Joris, B., Tabuchi, A., Nikolaidis, N. und Cosgrove, D. J. (2008) Crystal structure and activity of *Bacillus subtilis* YoaJ (EXLX1), a bacterial expansin that promotes root colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **105**, 16876-16881
- Kesavulu, M. M., Ramasubramanian, S. und Suguna, K. (2005) Effect of dimethyl sulphoxide on the crystal structure of porcine pepsin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**, 1510-1514
- Kieser, T., Bibb, M. J., M.J., B., K.F., C. und Hopwood, D. A. (2000). Practical *Streptomyces* Genetics. Colney, England. John Innes Foundation.
- Kikuchi, Y., Date, M., Yokoyama, K., Umezawa, Y. und Matsui, H. (2003) Secretion of active-form *Streptovercillium mobaraense* transglutaminase by *Corynebacterium glutamicum*: processing of the pro-transglutaminase by a cosecreted subtilisin-Like protease from *Streptomyces albogriseolus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 358-366
- Kim, D. W., Chater, K., Lee, K. J. und Hesketh, A. (2005) Changes in the extracellular proteome caused by the absence of the bldA gene product, a developmentally significant tRNA, reveal a new target for the pleiotropic regulator AdpA in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **187**, 2957-2966
- Kim, D. W., Hesketh, A., Kim, E. S., Song, J. Y., Lee, D. H., Kim, I. S., Chater, K. F. und Lee, K. J. (2008) Complex extracellular interactions of proteases and a protease inhibitor influence multicellular development of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* **70**, 1180-1193
- Kim, I. S. und Lee, K. J. (1995a) Physiological roles of leupeptin and extracellular proteases in mycelium development of *Streptomyces exfoliatus* SMF13. *Microbiology.* **141** (Pt 4), 1017-1025
- Kim, I. S. und Lee, K. J. (1995b) Kinetic study on the production and degradation of leupeptin in *Streptomyces exfoliatus* SMF13. *J. Biotechnol.* **42**, 35-44
- Kim, I. S. und Lee, K. J. (1996) Trypsin-like protease of *Streptomyces exfoliatus* SMF13, a potential agent in mycelial differentiation. *Microbiology.* **142** (Pt 7), 1797-1806

- Kim, I. S., Kang, S. G. und Lee, K. J. (1995) Physiological importance of trypsin like protease during morphological differentiation of *Streptomyces* spp. *Jour. Microbiol.* **33**, 315-321
- Kim, I. S., Kim, Y. B. und Lee, K. (1998) Characterization of the leupeptin-inactivating enzyme from *Streptomyces exfoliatus* SMF13 which produces leupeptin. *Biochem. J.* **331**, 539-545
- Klug, G., Jager, A., Heck, C. und Rauhut, R. (1997) Identification, sequence analysis, and expression of the lepB gene for a leader peptidase in *Rhodobacter capsulatus*. *Mol. Gen. Genet.* **253**, 666-673
- Kobayashi, K. (1996) ϵ -(γ -Glutamyl)lysine cross-links of spore coat proteins and transglutaminase activity in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **144**, 157-160
- Koch, A. W., Holstein, T. W., Mala, C., Kurz, E., Engel, J. und David, C. N. (1998) Spinalin, a new glycine- and histidine-rich protein in spines of *Hydra nematocysts*. *J. Cell Sci.* **111** (Pt 11), 1545-1554
- Kodani, S., Lodato, M. A., Durrant, M. C., Picart, F. und Willey, J. M. (2005) SapT, a lanthionine-containing peptide involved in aerial hyphae formation in the streptomycetes. *Mol. Microbiol.* **58**, 1368-1380
- Kodani, S., Hudson, M. E., Durrant, M. C., Buttner, M. J., Nodwell, J. R. und Willey, J. M. (2004) The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene ramS in *Streptomyces coelicolor*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **101**, 11448-11453
- Kojima, S., Obata, S., Kumagai, I. und Miura, K.-i. (1990) Alteration of the specificity of the *Streptomyces* subtilisin inhibitor by gene engineering. *Biotechnology.* **8**, 449-452
- Kojima, S., Nishiyama, Y., Kumagai, I. und Miura, K. (1991) Inhibition of subtilisin BPN' by reaction site P1 mutants of *Streptomyces* subtilisin inhibitor. *J. Biochem.* **109**, 377-382
- Kojima, S., Kumazaki, T., Ishii, S. und Miura, K. (1998) Primary structure of *Streptomyces griseus* metalloendopeptidase II. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 1392-1398
- Korn-Wendisch, F. und Kutzner, H. J. (1981). The familiy Streptomycetaceae.
- Kroppenstedt, R. M. (1985). Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms. In: Chemical methods in bacterial systematics, M. Goodfellow und D.E. Minikin, eds, London: Academic Press, pp. 173-199.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S. C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N. M., Choi, S. K., Codani, J. J., Connerton, I. F., Danchin, A. und et al. (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature.* **390**, 249-256
- Kuramoto, A., Lezhava, A., Taguchi, S., Momose, H. und Kinashi, H. (1996) The location and deletion of the genes which code for SSI-like protease inhibitors in *Streptomyces* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **139**, 37-42
- Lämmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-685
- Land, M., Lapidus, A., Mayilraj, S., Chen, F., Copeland, A., Del Rio, T. G., Nolan, M., Lucas, S., Tice, H., Cheng, J. F., Chertkov, O., Bruce, D., Goodwin, L., Pitluck, S., Rohde, M., Goker, M., Pati, A., Ivanova, N., Mavromatis, K., Chen, A., Palaniappan, K., Hauser, L., Chang, Y. J., Jeffries, C. C., Brettin, T., Detter, J. C., Han, C., Chain, P., Tindall, B. J., Bristow, J., Eisen, J. A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N. C. und Klenk, H. P. (2009) Complete genome sequence of *Actinosynnema mirum* type strain (101). *Stand. Genomic Sci.* **1**, 46-53
- LaVallie, E. R., DiBlasio, E. A., Kovacic, S., Grant, K. L., Schendel, P. F. und McCoy, J. M. (1993) A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology.* **11**, 187-193

- Le Calvez, H., Green, J. M. und Baty, D. (1996)** Increased efficiency of alkaline phosphatase production levels in *Escherichia coli* using a degenerate PelB signal sequence. *Gene*. **170**, 51-55
- Leblond, P., Demuyter, P., Simonet, J. M. und Decaris, B. (1990)** Genetic instability and hypervariability in *Streptomyces ambofaciens*: towards an understanding of a mechanism of genome plasticity. *Mol. Microbiol.* **4**, 707-714
- Lee, K. J. (1998)** Dynamics of morphological and physiological differentiation in actinomycetes group and quantitative analysis of the differentiation. *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**, 1-7
- Lei, S. P., Lin, H. C., Wang, S. S., Callaway, J. und Wilcox, G. (1987)** Characterization of the *Erwinia carotovora* pelB gene and its product pectate lyase. *J. Bacteriol.* **169**, 4379-4383
- Levy, R., Weiss, R., Chen, G., Iverson, B. L. und Georgiou, G. (2001)** Production of correctly folded Fab antibody fragment in the cytoplasm of *Escherichia coli* trxB gor mutants via the coexpression of molecular chaperones. *Protein Expr. Purif.* **23**, 338-347
- Li, W., Wu, J., Tao, W., Zhao, C., Wang, Y., He, X., Chandra, G., Zhou, X., Deng, Z., Chater, K. F. und Tao, M. (2007)** A genetic and bioinformatic analysis of *Streptomyces coelicolor* genes containing TTA codons, possible targets for regulation by a developmentally significant tRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **266**, 20-28
- Lijnen, H. R., Hoylaerts, M. und Collen, D. (1980)** Isolation and characterization of a human plasma protein with affinity for the lysine binding sites in plasminogen. Role in the regulation of fibrinolysis and identification as histidine-rich glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **255**, 10214-10222
- Lijnen, H. R., Hoylaerts, M. und Collen, D. (1983)** Heparin binding properties of human histidine-rich glycoprotein. Mechanism and role in the neutralization of heparin in plasma. *J. Biol. Chem.* **258**, 3803-3808
- Little, J. W. (1993)** LexA cleavage and other self-processing reactions. *J. Bacteriol.* **175**, 4943-4950
- Lorand, L. und Conrad, S. M. (1984)** Transglutaminases. *Mol. Cell Biochem.* **58**, 9-35
- Lukomski, S., Montgomery, C. A., Rurangirwa, J., Geske, R. S., Barrish, J. P., Adams, G. J. und Musser, J. M. (1999)** Extracellular cysteine protease produced by *Streptococcus pyogenes* participates in the pathogenesis of invasive skin infection and dissemination in mice. *Infect Immun.* **67**, 1779-1788
- Lusson, J., Benjannet, S., Hamelin, J., Savaria, D., Chretien, M. und Seidah, N. G. (1997)** The integrity of the RRGDL sequence of the proprotein convertase PC1 is critical for its zymogen and C-terminal processing and for its cellular trafficking. *J. Biochem.* **326** (Pt 3), 737-744
- Ma, H. und Kendall, K. (1994)** Cloning and analysis of a gene cluster from *Streptomyces coelicolor* that causes accelerated aerial mycelium formation in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* **176**, 3800-3811
- Makarova, K. S., Aravind, L. und Koonin, E. V. (1999)** A superfamily of archeal, bacterial, and eukaryotic proteins homologous to animal transglutaminases. *Protein Sci.* **8**, 1714-1719
- Manteca, A., Alvarez, R., Salazar, N., Yague, P. und Sanchez, J. (2008)** Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 3877-3886
- Mao, Y., Varoglu, M. und Sherman, D. H. (1999)** Molecular characterization and analysis of the biosynthetic gene cluster for the antitumor antibiotic mitomycin C from *Streptomyces lavendulae* NRRL 2564. *Chem. Biol.* **6**, 251-263
- Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J. B., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., DeWeese-Scott, C., Fong, J. H., Geer, L. Y., Geer, R. C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Hurwitz, D. I., Jackson, J. D., Ke, Z., Lanczycki, C. J., Lu, F., Marchler, G. H., Mullokandov, M., Omelchenko, M. V., Robertson, C. L., Song, J. S., Thanki, N., Yamashita, R. A., Zhang, D., Zhang, N., Zheng, C. und Bryant, S. H. (2011)** CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res.* **39**, D225-229

- Mariniello, L. und Porta, R. (2005)** Transglutaminases as biotechnological tools. *Prog. Exp. Tum. Res.* **38**, 174-191
- Martoglio, B. und Dobberstein, B. (1998)** Signal sequences: More than just a greasy peptides. *trends in CELL BIOLOGY.* **8**, 410-415
- Massimi, I., Park, E., Rice, K., Muller-Esterl, W., Sauder, D. und McGavin, M. J. (2002)** Identification of a novel maturation mechanism and restricted substrate specificity for the SspB cysteine protease of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **277**, 41770-41777
- Matsudaira, P. (1987)** Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* **262**, 10035-10038
- Mayfield, C. I., Williams, S. T., Ruddick, S. M. und Hatfield, H. L. (1972)** Studies on the ecology of actinomycetes in soil. IV. Observation on the form and growth of streptomycetes in soil. *Soil Biol. Biochem.* **4**, 79-91
- Mazmanian, S. K., Liu, G., Ton-That, H. und Schneewind, O. (1999)** *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science.* **285**, 760-763
- Mazmanian, S. K., Ton-That, H., Su, K. und Schneewind, O. (2002)** An iron-regulated sortase anchors a class of surface protein during *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **99**, 2293-2298
- Medema, M. H., Trefzer, A., Kovalchuk, A., van den Berg, M., Muller, U., Heijne, W., Wu, L., Alam, M. T., Ronning, C. M., Nierman, W. C., Bovenberg, R. A., Breitling, R. und Takano, E. (2010)** The sequence of a 1.8-mb bacterial linear plasmid reveals a rich evolutionary reservoir of secondary metabolic pathways. *Genome Biol. Evol.* **2**, 212-224
- Mehling, A., Wehmeier, U. F. und Piepersberg, W. (1995a)** Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays in identifying conserved regions of actinomycete genomes. *FEMS Microbiol. Lett.* **128**, 119-126
- Mehling, A., Wehmeier, U. F. und Piepersberg, W. (1995b)** Nucleotide sequences of streptomycete 16S ribosomal DNA: towards a specific identification system for streptomycetes using PCR. *Microbiology.* **141 (Pt 9)**, 2139-2147
- Mehrel, T., Hohl, D., Rothnagel, J. A., Longley, M. A., Bundman, D., Cheng, C., Lichti, U., Bisher, M. E., Steven, A. C., Steinert, P. M. und et al. (1990)** Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin. *Cell.* **61**, 1103-1112
- Mendez, C., Brana, A. F., Manzanal, M. B. und Hardisson, C. (1985)** Role of substrate mycelium in colony development in *Streptomyces*. *Can. J. Microbiol.* **31**, 446-450
- Merrick, M. J. (1976)** A morphological and genetic mapping study of bald colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.* **96**, 299-315
- Merrifield, R. B. (1964)** Solid-Phase Peptide Synthesis. 3. An Improved Synthesis of Bradykinin. *Biochemistry.* **3**, 1385-1390
- Migueluez, E. M., Hardisson, C. und Manzanal, M. B. (1999)** Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote. *J. Cell Biol.* **145**, 515-525
- Migueluez, E. M., Hardisson, C. und Manzanal, M. B. (2000)** Streptomycetes: a new model to study cell death. *Internati. Microbiol.* **3**, 153-158
- Mitchell, A. R. (2008)** Bruce Merrifield and solid-phase peptide synthesis: a historical assessment. *Biopolymers.* **90**, 175-184
- Mitsui, Y., Satow, Y., Sakamaki, T. und Iitaka, Y. (1977)** Crystal structure of a protein proteinase inhibitor, *Streptomyces* subtilisin inhibitor, at 2.3 angstrom resolution. *J. Biochem.* **82**, 295-298
- Mitsui, Y., Satow, Y., Watanabe, Y., Hirono, S. und Iitaka, Y. (1979)** Crystal structures of *Streptomyces* subtilisin inhibitor and its complex with subtilisin BPN'. *Nature.* **277**, 447-452
- Miyadoh, S. (1990)** A history of systematics and a concept of species in Streptomycetes. *Actinomycetol.* **4**, 41-48

- Morgan, W. T. (1978)** Human serum histidine-rich glycoprotein. I. Interactions with heme, metal ions and organic ligands. *Biochim. Biophys. Acta.* **535**, 319-333
- Murray-Lyon, I. M., Eddleston, A. L., Williams, R., Brown, M., Hogbin, B. M., Bennett, A., Edwards, J. C. und Taylor, K. W. (1968)** Treatment of multiple-hormone-producing malignant islet-cell tumour with streptozotocin. *Lancet.* **2**, 895-898
- Navarre, W. W. und Schneewind, O. (1994)** Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **14**, 115-121
- Nemes, Z., Csösz, E., Petrovski, G. und Fesüs, L. (2005)** Structure-Function Relationships of Transglutaminases - A contemporary View. *Prog. Exp. Tum. Res.* **38**, 19-36
- Neumann, H., Hancock, S. M., Buning, R., Routh, A., Chapman, L., Somers, J., Owen-Hughes, T., van Noort, J., Rhodes, D. und Chin, J. W. (2009)** A method for genetically installing site-specific acetylation in recombinant histones defines the effects of H3 K56 acetylation. *Mol. Cell.* **36**, 153-163
- Nguyen, K. T., Tenor, J., Stettler, H., Nguyen, L. T., Nguyen, L. D. und Thompson, C. J. (2003)** Colonial Differentiation in *Streptomyces coelicolor* Depends on Translation of a Specific Codon within the *adpA* Gene. *J. Bacteriol.* **185**, 7291-7296
- Nicieza, R. G., Huergo, J., Connolly, B. A. und Sanchez, J. (1999)** Purification, characterization, and role of nucleases and serine proteases in *Streptomyces* differentiation. Analogies with the biochemical processes described in late steps of eukaryotic apoptosis. *J. Biol. Chem.* **274**, 20366-20375
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. und von Heijne, G. (1997)** Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* **10**, 1-6
- Nilsson, I. und von Heijne, G. (1992)** A signal peptide with a proline next to the cleavage site inhibits leader peptidase when present in a sec-independent protein. *FEBS Lett.* **299**, 243-246
- Nodwell, J. R. und Losick, R. (1998)** Purification of an extracellular signaling molecule involved in production of aerial mycelium by *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **180**, 1334-1337
- Nodwell, J. R., McGovern, K. und Losick, R. (1996)** An oligopeptide permease responsible for the import of an extracellular signal governing aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* **22**, 881-893
- Nolling, J., Breton, G., Omelchenko, M. V., Makarova, K. S., Zeng, Q., Gibson, R., Lee, H. M., Dubois, J., Qiu, D., Hitti, J., Wolf, Y. I., Tatusov, R. L., Sabathe, F., Doucette-Stamm, L., Soucaille, P., Daly, M. J., Bennett, G. N., Koonin, E. V. und Smith, D. R. (2001)** Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* **183**, 4823-4838
- Nonaka, M., Tanaka, H., Okiyama, A., Motoki, M., Ando, H., Umeda, K. und Matsuura, A. (1989)** Polymerization of several proteins by Ca(2+)-independent transglutaminase derived from microorganisms [supposed to belong to the genus *Streptoverticillium*]. *Agric. Biol. Chem.* **43**, 2619-2623
- Oda, K., Koyama, T. und Murao, S. (1979)** Purification and properties of a proteinaceous metallo-proteinase inhibitor from *Streptomyces nigrescens* TK-23. *Biochim. Biophys. Acta.* **571**, 147-156
- Oda, K., Takahashi, S., Kikuchi, N. und Shibano, Y. (1996)** A novel proteinaceous Kex 2 proteinase inhibitor, kexstatin, from *Streptomyces platensis* Q268. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**, 1388-1389
- Ohnishi, Y., Yamazaki, H., Kato, J. Y., Tomono, A. und Horinouchi, S. (2005)** AdpA, a Central Transcriptional Regulator in the A-Factor Regulatory Cascade That Leads to Morphological Development and Secondary Metabolism in *Streptomyces griseus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 431-439
- Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H., Yamashita, A., Hattori, M. und Horinouchi, S. (2008)** Genome sequence of the streptomycin-

- producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J. Bacteriol.* **190**, 4050-4060
- Ohtsuka, T., Sawa, A., Kawabata, R., Nio, N. und Motoki, M. (2000)** Substrate specificities of microbial transglutaminase for primary amines. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 6230-6233
- Omura, S. (1992)** The expanded horizon for microbial metabolites—a review. *Gene.* **115**, 141-149
- Onaka, H. und Horinouchi, S. (1997)** DNA-binding activity of the A-factor receptor protein and its recognition DNA sequences. *Mol. Microbiol.* **24**, 991-1000
- Paetzel, M., Karla, A., Strynadka, N. C. und Dalbey, R. E. (2002)** Signal peptidases. *Chem. Rev.* **102**, 4549-4580
- Palacin, A., Parro, V., Geukens, N., Anne, J. und Mellado, R. P. (2002)** SipY Is the *Streptomyces lividans* type I signal peptidase exerting a major effect on protein secretion. *J. Bacteriol.* **184**, 4875-4880
- Pallen, M. J., Lam, A. C., Antonio, M. und Dunbar, K. (2001)** An embarrassment of sortases - a richness of substrates? *Trends Microbiol.* **9**, 97-102
- Park, J. T. und Uehara, T. (2008)** How bacteria consume their own exoskeletons (turnover and recycling of cell wall peptidoglycan). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**, 211-227, table of contents
- Parro, V., Schacht, S., Anne, J. und Mellado, R. P. (1999)** Four genes encoding different type I signal peptidases are organized in a cluster in *Streptomyces lividans* TK21. *Microbiology.* **145** (Pt 9), 2255-2263
- Pasternack, R., Dorsch, S., Otterbach, J. T., Robenek, I. R., Wolf, S. und Fuchsbauer, H. L. (1998)** Bacterial pro-transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense* Purification, characterisation and sequence of the zymogen. *Eur. J. Biochem.* **257**, 570-576
- Pedersen, L. C., Yee, V. C., Bishop, P. D., Le Trong, I., Teller, D. C. und Stenkamp, R. E. (1994)** Transglutaminase factor XIII uses proteinase-like catalytic triad to crosslink macromolecules. *Protein Sci.* **3**, 1131-1135
- Perlman, D. und Halvorson, H. O. (1983)** A putative signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic and prokaryotic signal peptides. *J. Mol. Biol.* **167**, 391-409
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G. und Nielsen, H. (2011)** SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods.* **8**, 785-786
- Piepersberg, W. (2002)**. Endogenous antimicrobial molecules - An ecological perspective. In: Molecular Medical Biology, M. Sussman, ed, New York: Academic Press, pp. 561 – 584.
- Piepersberg, W., Rehm, H.-J., Reed, G., Pühler, A. und Stadler, P. (1993)**. Streptomycetes and Corynebacteria. Weinheim. Biotechnology. 2nd edition. Biological fundamentals. VCH.
- Potempa, J. und Pike, R. N. (2005)** Bacterial peptidases. *Contrib. Microbiol.* **12**, 132-180
- Pullan, S. T., Chandra, G., Bibb, M. J. und Merrick, M. (2011)** Genome-wide analysis of the role of GlnR in *Streptomyces venezuelae* provides new insights into global nitrogen regulation in actinomycetes. *BMC Genomics.* **12**, 175
- Ragkousi, K. und Setlow, P. (2004)** Transglutaminase-mediated cross-linking of GerQ in the coats of *Bacillus subtilis* spores. *J. Bacteriol.* **186**, 5567-5575
- Read, T. D., Peterson, S. N., Tourasse, N., Baillie, L. W., Paulsen, I. T., Nelson, K. E., Tettelin, H., Fouts, D. E., Eisen, J. A., Gill, S. R., Holtzapple, E. K., Okstad, O. A., Helgason, E., Rilstone, J., Wu, M., Kolonay, J. F., Beanan, M. J., Dodson, R. J., Brinkac, L. M., Gwinn, M., DeBoy, R. T., Madpu, R., Daugherty, S. C., Durkin, A. S., Haft, D. H., Nelson, W. C., Peterson, J. D., Pop, M., Khouri, H. M., Radune, D., Benton, J. L., Mahamoud, Y., Jiang, L., Hance, I. R., Weidman, J. F., Berry, K. J., Plaut, R. D., Wolf, A. M., Watkins, K. L., Nierman, W. C., Hazen, A., Cline, R., Redmond, C., Thwaite, J. E., White, O., Salzberg, S. L., Thomason, B., Friedlander, A. M., Koehler, T. M., Hanna, P. C., Kolsto, A. B. und Fraser, C. M. (2003)** The

- genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. *Nature*. **423**, 81-86
- Redenbach, M. und Altenbuchner, J. (2002)** Warum haben einige Bakterien lineare Chromosome? *BIOspektrum*. **8**, 158-163
- Reith, J. und Mayer, C. (2011)** Peptidoglycan turnover and recycling in Gram-positive bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **92**, 1-11
- Ren, Z., Zhang, D., Yu, M., Zhao, Q., Du, G., Chen, J. und Wu, J. (2008)** Identification of the gene encoding transglutaminase zymogen from *Streptomyces hygroscopicus* and its expression in *Escherichia coli*. *Wei Sheng Wu Xue Bao*. **48**, 480-485
- Richter, M., Willey, J. M., Süßmuth, R., Jung, G. und Fiedler, H.-P. (1988)** Streptofactin, a novel biosurfactant with aerial mycelium inducing activity from *Streptomyces tendae* Tü 901/8c. *FEMS Microbiol. Lett.* **163**, 165-171
- Robinson, M. W. und Dalton, J. P. (2011)**. Cysteine Proteases of Pathogenic Organisms. In: Advances in Experimental Medicine and Biology, M.W. Robinson und J.P. Dalton, eds, Springer.
- Roderick, S. L., Fournie-Zaluski, M. C., Roques, B. P. und Matthews, B. W. (1989)** Thiorphan and retro-thiorphan display equivalent interactions when bound to crystalline thermolysin. *Biochemistry*. **28**, 1493-1497
- Rovere, C., Luis, J., Lissitzky, J. C., Basak, A., Marvaldi, J., Chretien, M. und Seidah, N. G. (1999)** The RGD motif and the C-terminal segment of proprotein convertase 1 are critical for its cellular trafficking but not for its intracellular binding to integrin $\alpha 5 \beta 1$. *J. Biol. Chem.* **274**, 12461-12467
- Rudenskaya, G. N. und Pupov, D. V. (2008)** Cysteine proteinases of microorganisms and viruses. *Biochemistry (Mosc)*. **73**, 1-13
- Ruf, A., Stihle, M., Benz, J., Schmidt, M. und Sobek, H. (2013)** Structure of Gentlyase, the neutral metalloprotease of *Paenibacillus polymyxa*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. **69**, 24-31
- Rüther, U. (1980)** Construction and properties of a new cloning vehicle allowing direct screening for recombinant plasmids. *Mol. Gen. Genet.* **178**, 475-477
- Saigo, K., Shatsky, M., Levitt, L. J. und Leung, L. K. (1989)** Interaction of histidine-rich glycoprotein with human T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **264**, 8249-8253
- Sakai, M., Odani, S. und Ikenaka, T. (1980)** Importance of the carboxyl-terminal four amino acid residues in the inhibitory activity of *Streptomyces* subtilisin inhibitor (with a revision of its carboxyl-terminal sequence). *J. Biochem.* **87**, 891-898
- Sampedro, J. und Cosgrove, D. J. (2005)** The expansin superfamily. *Genome Biol.* **6**, 242
- Sarafeddinov, A., Arif, A., Peters, A. und Fuchsbauer, H. L. (2011)** A Novel Transglutaminase Substrate from *Streptomyces mobaraensis* Inhibiting Papain-Like Cysteine Proteases. *J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 617-626
- Sarafeddinov, A., Schmidt, S., Adolf, F., Mainusch, M., Bender, A. und Fuchsbauer, H.-L. (2009)** A Novel Transglutaminase Substrate from *Streptomyces mobaraensis* Triggers Autolysis of Neutral Metalloproteases. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 993-999
- Sawyer, E. B., Claessen, D., Haas, M., Hurgobin, B. und Gras, S. L. (2011)** The assembly of individual chaplin peptides from *Streptomyces coelicolor* into functional amyloid fibrils. *PLoS ONE*. **6**, e18839
- Schatz, A., Bugie, E. und Waksman, S. (1944)**. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. In: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., pp. 66-69.
- Schmidt, S. (2008)**. Intrinsische Substratproteine der Transglutaminase von *Streptomyces mobaraensis*: Identifizierung und Charakterisierung. Dissertation, Technische Universität Darmstadt.
- Schmidt, S., Adolf, F. und Fuchsbauer, H. L. (2008)** The transglutaminase activating metalloprotease inhibitor from *Streptomyces mobaraensis* is a glutamine and lysine donor substrate of the intrinsic transglutaminase. *FEBS Lett.* **582**, 3132-3138

- Schultz, C. P. (2000) Illuminating folding intermediates. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 7-10
- Seeram, S. S., Hiraga, K., Saji, A., Tashiro, M. und Oda, K. (1997) Identification of reactive site of a proteinaceous metalloproteinase inhibitor from *Streptomyces nigrescens* TK-23. *J. Biochem.* **121**, 1088-1095
- Shen, A., Lipardus, P. J., Morell, M., Ponder, E. L., Sadaghiani, A. M., Garcia, C. und Bogyo, M. (2009) Simplified, Enhanced Protein Purification Using an inducible, autoprocessing Enzyme Tag. *PLoS ONE*. **4**, 1-11
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V. und Mann, M. (2006) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* **1**, 2856-2860
- Shindo, T. und Van der Hoorn, R. A. (2008) Papain-like cysteine proteases: key players at molecular battlefields employed by both plants and their invaders. *Mol. Plant Pathol.* **9**, 119-125
- Shirling, E. B. und Gottlieb, D. (1966) Methods for Characterization of *Streptomyces* Species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**, 313-340
- Silhavy, T. J., Benson, S. A. und Emr, S. D. (1983) Mechanisms of protein localization. *Microbiol. Rev.* **47**, 313-344
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. und Klenk, D. C. (1985) Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85
- Smucker, R. A. und Pfister, R. M. (1978) Characteristics of *Streptomyces coelicolor* A3(2) aerial spore rodlet mosaic. *Can. J. Microbiol.* **24**, 397-408
- Song, J. Y., Jeong, H., Yu, D. S., Fischbach, M. A., Park, H. S., Kim, J. J., Seo, J. S., Jensen, S. E., Oh, T. K., Lee, K. J. und Kim, J. F. (2010) Draft genome sequence of *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585, a producer of diverse secondary metabolites. *J. Bacteriol.* **192**, 6317-6318
- Spanswick, V. J., Cummings, J. und Smyth, J. F. (1998) Current issues in the enzymology of mitomycin C metabolic activation. *Gen Pharmacol.* **31**, 539-544
- Steinert, P. M., Mack, J. W., Korge, B. P., Gan, S. Q., Haynes, S. R. und Steven, A. C. (1991) Glycine loops in proteins: their occurrence in certain intermediate filament chains, loricins and single-stranded RNA binding proteins. *Int. J. Biol. Macromol.* **13**, 130-139
- Taguchi, S., Odaka, A., Watanabe, Y. und Momose, H. (1995) Molecular characterization of a gene encoding extracellular serine protease isolated from a subtilisin inhibitor-deficient mutant of *Streptomyces albobovis* S-3253. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 180-186
- Taguchi, S., Kojima, S., Terabe, M., Miura, K. und Momose, H. (1994) Comparative studies on the primary structures and inhibitory properties of subtilisin-trypsin inhibitors from *Streptomyces*. *Eur. J. Biochem.* **220**, 911-918
- Taguchi, S., Kikuchi, H., Suzuki, M., Kojima, S., Terabe, M., Miura, K.-i., Nakase, T. und Momose, H. (1993) Streptomyces Subtilisin Inhibitor-Like Proteins Are Distributed Widely in Streptomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 4338-4341
- Taguchi, S., Kojima, S., Terabe, M., Kumazawa, Y., Kohriyama, H., Suzuki, M., Miura, K. und Momose, H. (1997) Molecular phylogenetic characterization of *Streptomyces* protease inhibitor family. *J. Mol. Evol.* **44**, 542-551
- Takano, E., Tao, M., Long, F., Bibb, M. J., Wang, L., Li, W., Buttner, M. J., Bibb, M. J., Deng, Z. und Chater, K. F. (2003) A rare leucine codon in adpA is implicated in the morphological defect of bldA mutants of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* **50**, 475-486
- Takeuchi, Y., Satow, Y., Nakamura, K. T. und Mitsui, Y. (1991a) Refined crystal structure of the complex of subtilisin BPN' and *Streptomyces* subtilisin inhibitor at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **221**, 309-325

- Takeuchi, Y., Nonaka, T., Nakamura, K. T., Kojima, S., Miura, K. und Mitsui, Y. (1992) Crystal structure of an engineered subtilisin inhibitor complexed with bovine trypsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **89**, 4407-4411
- Takeuchi, Y., Noguchi, S., Satow, Y., Kojima, S., Kumagai, I., Miura, K., Nakamura, K. T. und Mitsui, Y. (1991b) Molecular recognition at the active site of subtilisin BPN': crystallographic studies using genetically engineered proteinaceous inhibitor SSI (*Streptomyces* subtilisin inhibitor). *Protein Eng.* **4**, 501-508
- Tillotson, R. D., Wösten, H. A., Richter, M. und Willey, J. M. (1998) A surface active protein involved in aerial hyphae formation in the filamentous fungus *Schizophyllum commune* restores the capacity of a bald mutant of the filamentous bacterium *Streptomyces coelicolor* to erect aerial structures. *Mol. Microbiol.* **30**, 595-602
- Tjalsma, H., Zanen, G., Venema, G., Bron, S. und van Dijk, J. M. (1999) The potential active site of the lipoprotein-specific (type II) signal peptidase of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **274**, 28191-28197
- Tjalsma, H., Noback, M. A., Bron, S., Venema, G., Yamane, K. und van Dijk, J. M. (1997) *Bacillus subtilis* contains four closely related type I signal peptidases with overlapping substrate specificities. Constitutive and temporally controlled expression of different sip genes. *J. Biol. Chem.* **272**, 25983-25992
- Tjalsma, H., Bolhuis, A., van Roosmalen, M. L., Wiegert, T., Schumann, W., Broekhuizen, C. P., Quax, W. J., Venema, G., Bron, S. und van Dijk, J. M. (1998) Functional analysis of the secretory precursor processing machinery of *Bacillus subtilis*: identification of a eubacterial homolog of archaeal and eukaryotic signal peptidases. *Genes Dev.* **12**, 2318-2331
- Tobes, R. und Ramos, J. L. (2002) AraC-XylS database: A family of positive transcriptional regulators in bacteria. *Nucleic Acids Res.* **30**, 318-321
- Tomasz, M. und Palom, Y. (1997) The mitomycin bioreductive antitumor agents: cross-linking and alkylation of DNA as the molecular basis of their activity. *Pharmacol Ther.* **76**, 73-87
- Tomono, A., Tsai, Y., Ohnishi, Y. und Horinouchi, S. (2005) Three chymotrypsin genes are members of the AdpA regulon in the A-factor regulatory cascade in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **187**, 6341-6353
- Tripathi, G. und Rawal, S. K. (1998) Simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from *Streptomyces aureofaciens*. *Biotechnology Techniques.* **12**, 629-631
- Tschantz, W. R., Sung, M., Delgado-Partin, V. M. und Dalbey, R. E. (1993) A serine and a lysine residue implicated in the catalytic mechanism of the *Escherichia coli* leader peptidase. *J. Biol. Chem.* **268**, 27349-27354
- Tsuyuki, H., Kajiwar, K., Fujita, A., Kumazaki, T. und Ishii, S. (1991) Purification and characterization of *Streptomyces griseus* metalloendopeptidases I and II. *J. Biochem.* **110**, 339-344
- Umezawa, Y., Yokoyama, K., Kikuchi, Y., Date, M., Ito, K., Yoshimoto, T. und Matsui, H. (2004) Novel Prolyl Tri/Tetra-Peptidyl Aminopeptidase from *Streptomyces mobaraensis*: Substrate Specificity and Enzyme Gene Cloning. *J. Biochem.* **136**, 293-300
- van Dijk, J. M., de Jong, A., Venema, G. und Bron, S. (1995) Identification of the potential active site of the signal peptidase SipS of *Bacillus subtilis*. Structural and functional similarities with LexA-like proteases. *J. Biol. Chem.* **270**, 3611-3618
- van Dijk, J. M., de Jong, A., Vehmaanpera, J., Venema, G. und Bron, S. (1992) Signal peptidase I of *Bacillus subtilis*: patterns of conserved amino acids in prokaryotic and eukaryotic type I signal peptidases. *EMBO J.* **11**, 2819-2828
- Van Mellaert, L., Lammertyn, E., Schacht, S., Proost, P., Van Damme, J., Wroblewski, B., Anne, J., Scarcez, T., Sablon, E., Raeymaeckers, J. und Van Broekhoven, A. (1998) Molecular characterization of a novel subtilisin inhibitor protein produced by *Streptomyces venezuelae* CBS762.70. *DNA Seq.* **9**, 19-30

- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K. F. und van Sinderen, D. (2007) Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 495-548
- Viollier, P. H., Minas, W., Dale, G. E., Folcher, M. und Thompson, C. J. (2001) Role of acid metabolism in *Streptomyces coelicolor* morphological differentiation and antibiotic biosynthesis. *J. Bacteriol.* **183**, 3184-3192
- Voelskow, H. (1981). Methoden der zielorientierten Stammsolierung. In: Jahrbuch Biotechnologie, München: Carl Hanser Verlag, pp. 343-361.
- von Heijne, G. und Abrahmsen, L. (1989) Species-specific variation in signal peptide design. Implications for protein secretion in foreign hosts. *FEBS Lett.* **244**, 439-446
- Wang, J., Soisson, S. M., Young, K., Shoop, W., Kodali, S., Galgoci, A., Painter, R., Parthasarathy, G., Tang, Y. S., Cummings, R., Ha, S., Dorso, K., Motyl, M., Jayasuriya, H., Ondeyka, J., Herath, K., Zhang, C., Hernandez, L., Allocco, J., Basilio, A., Tormo, J. R., Genilloud, O., Vicente, F., Pelaez, F., Colwell, L., Lee, S. H., Michael, B., Felcetto, T., Gill, C., Silver, L. L., Hermes, J. D., Bartizal, K., Barrett, J., Schmatz, D., Becker, J. W., Cully, D. und Singh, S. B. (2006) Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. *Nature.* **441**, 358-361
- Wang, X. J., Yan, Y. J., Zhang, B., An, J., Wang, J. J., Tian, J., Jiang, L., Chen, Y. H., Huang, S. X., Yin, M., Zhang, J., Gao, A. L., Liu, C. X., Zhu, Z. X. und Xiang, W. S. (2010) Genome sequence of the milbemycin-producing bacterium *Streptomyces bingchenggensis*. *J. Bacteriol.* **192**, 4526-4527
- Washizu, K., Ando, K., Koikeda, S., Hirose, S. und Matsuura, A. (1994) Molecular Cloning of the Gene for Microbial Transglutaminase from *Streptoverticillium* and its expression in *Streptomyces lividans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 82-87
- Weimer, S., Oertel, K. und Fuchsbauer, H. L. (2006) A quenched fluorescent dipeptide for assaying dispase- and thermolysin-like proteases. *Anal. Biochem.* **352**, 110-119
- Wellington, E. M. H., Cresswell, N. und Herron, P. R. (1992) Gene transfer between Streptomycetes in soil. *Gene.* **115**, 193-198
- White, O., Eisen, J. A., Heidelberg, J. F., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Dodson, R. J., Haft, D. H., Gwinn, M. L., Nelson, W. C., Richardson, D. L., Moffat, K. S., Qin, H., Jiang, L., Pamphile, W., Crosby, M., Shen, M., Vamathevan, J. J., Lam, P., McDonald, L., Utterback, T., Zalewski, C., Makarova, K. S., Aravind, L., Daly, M. J., Minton, K. W., Fleischmann, R. D., Ketchum, K. A., Nelson, K. E., Salzberg, S., Smith, H. O., Venter, J. C. und Fraser, C. M. (1999) Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science.* **286**, 1571-1577
- Wildermuth, H. (1970a) Surface structure of streptomycete spores as revealed by negative staining and freeze-etching. *J. Bacteriol.* **101**, 318-322
- Wildermuth, H. (1970b) Development and organization of the aerial mycelium in *Streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.* **60**, 43-50
- Wildermuth, H. (1972a) The surface structure of spores and aerial hyphae in *Streptomyces viridochromogenes*. *Arch. Mikrobiol.* **81**, 309-320
- Wildermuth, H. (1972b) Morphological surface characteristics of *Streptomyces glaucescens* and *S. acrimycini*, two streptomycetes with "hairy" spores. *Arch. Mikrobiol.* **81**, 321-332
- Wildermuth, H., Wehrli, E. und Horne, R. W. (1971) The surface structure of spores and aerial mycelium in *Streptomyces coelicolor*. *J. Ultrastruct. Res.* **35**, 168-180
- Willey, J., Schwedock, J. und Losick, R. (1993) Multiple extracellular signals govern the production of a morphogenetic protein involved in aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*. *Genes Dev.* **7**, 895-903
- Willey, J., Santamaria, R., Guijarro, J., Geistlich, M. und Losick, R. (1991) Extracellular complementation of a developmental mutation implicates a small sporulation protein in aerial mycelium formation by *S. coelicolor*. *Cell.* **65**, 641-650

- Williams, S. T., Bradshaw, R. M., Costerton, J. W. und Forge, A. (1972)** Fine structure of the spore sheath of some *Streptomyces* species. *J. Gen. Microbiol.* **72**, 249-258
- Witt, D. und Stäckebrandt, E. (1990)** Unification of the Genera *Streptoverticillum* and *Streptomyces*, and Amendment of *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339AL. *Systematic and Applied Microbiology.* **13**, 361-371
- Wösten, H. A. und Willey, J. M. (2000)** Surface-active proteins enable microbial aerial hyphae to grow into the air. *Microbiology.* **146** (Pt 4), 767-773
- Wu, H., Shuang, Q., Chenyang, L., Zheng, H., Zhou, X., Bai, L. und Deng, Z. (2012)** Genomic and transcriptomic insights into the thermo-regulated biosynthesis of validamycin in *Streptomyces hygroscopicus* 5008. *BMC Genomics.* **13**, 337
- Xu, B., Hellman, U., Ersson, B. und Janson, J. C. (2000)** Purification, characterization and amino-acid sequence analysis of a thermostable, low molecular mass endo-beta-1,4-glucanase from blue mussel, *Mytilus edulis*. *Eur. J. Biochem.* **267**, 4970-4977
- Xu, H., Chater, K. F., Deng, Z. und Tao, M. (2008)** A cellulose synthase-like protein involved in hyphal tip growth and morphological differentiation in *streptomyces*. *J. Bacteriol.* **190**, 4971-4978
- Xu, Q., Rawlings, N. D., Chiu, H.-J., Jaroszewski, L., Klock, H. E., Knuth, M. W., Miller, M. D., Elsliger, M.-A., Deacon, A. M., Godzik, A., Lesley, S. A. und Wilson, I. A. (2011)** Structural Analysis of Papain-Like NlpC/P60 Superfamily Enzymes with a Circularly Permuted Topology Reveals Potential Lipid Binding Sites. *PLoS ONE.* **6**, 1-10
- Xu, W., Huang, J., Lin, R., Shi, J. und Cohen, S. N. (2010)** Regulation of morphological differentiation in *S. coelicolor* by RNase III (AbsB) cleavage of mRNA encoding the AdpA transcription factor. *Mol. Microbiol.* **75**, 781-791
- Yamazaki, H., Ohnishi, Y. und Horinouchi, S. (2000)** An A-factor-dependent extracytoplasmic function sigma factor (sigma(AdsA)) that is essential for morphological development in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **182**, 4596-4605
- Yamazaki, H., Tomono, A., Ohnishi, Y. und Horinouchi, S. (2004)** DNA-binding specificity of AdpA, a transcriptional activator in the A-factor regulatory cascade in *Streptomyces griseus*. *Mol. Microbiol.* **53**, 555-572
- Yu, H.-M., Chen, S.-T. und Wang, K.-T. (1992)** Enhanced coupling efficiency in solid-phase peptide synthesis by microwave irradiation. *J. Org. Chem.* **57**, 4781-4784
- Zhang, D., Wang, M., Du, G., Zhao, Q., Wu, J. und Chen, J. (2008a)** Surfactant protein of the *Streptomyces* subtilisin inhibitor family inhibits transglutaminase activation in *Streptomyces hygroscopicus*. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 3403-3408
- Zhang, D., Wang, M., Wu, J., Cui, L., Du, G. und Chen, J. (2008b)** Two different proteases from *Streptomyces hygroscopicus* are involved in transglutaminase activation. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 10261-10264
- Zhao, W., Zhong, Y., Yuan, H., Wang, J., Zheng, H., Wang, Y., Cen, X., Xu, F., Bai, J., Han, X., Lu, G., Zhu, Y., Shao, Z., Yan, H., Li, C., Peng, N., Zhang, Z., Zhang, Y., Lin, W., Fan, Y., Qin, Z., Hu, Y., Zhu, B., Wang, S., Ding, X. und Zhao, G. P. (2010)** Complete genome sequence of the rifamycin SV-producing *Amycolatopsis mediterranei* U32 revealed its genetic characteristics in phylogeny and metabolism. *Cell Res.* **20**, 1096-1108
- Zhou, A., Martin, S., Lipkind, G., LaMendola, J. und Steiner, D. F. (1998)** Regulatory roles of the P domain of the subtilisin-like prohormone convertases. *J. Biol. Chem.* **273**, 11107-11114
- Zilhao, R., Istatico, R., Martins, L. O., Steil, L., Volker, U., Ricca, E., Moran, C. P., Jr. und Henriques, A. O. (2005)** Assembly and function of a spore coat-associated transglutaminase of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **187**, 7753-7764
- Zotzel, J. (2002).** Aktivierung von Transglutaminase von *Streptomyces mobaraensis* und ihre Regulation. Dissertation, Technische Universität Darmstadt.

- Zotzel, J., Keller, P. und Fuchsbauer, H. L. (2003a)** Transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* is activated by an endogenous metalloprotease. *Eur. J. Biochem.* **270**, 3214-3222
- Zotzel, J., Pasternack, R., Pelzer, C., Ziegert, D., Mainusch, M. und Fuchsbauer, H.-L. (2003b)** Activated transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* is processed by a tripeptidyl aminopeptidase in the final step. *Eur. J. Biochem.* **270**, 4149-4155

6. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 2009 bis März 2013 im Fachbereich Chemie und Biotechnologie der Hochschule Darmstadt unter der Leitung von Prof. Dr. Hans-Lothar Fuchsbauer durchgeführt.

Sie wäre nicht zustande gekommen, wenn ich nicht diese breite Unterstützung und Hilfe gehabt hätte. Daher möchte ich mich ganz herzlich bedanken bei:

Herrn Prof. Dr. Hans-Lothar Fuchsbauer vom Fachbereich Chemie und Biotechnologie der Hochschule Darmstadt für die Überlassung des Themas, für die fachliche Unterstützung, die konstruktiven Diskussionen, fachlichen Hinweise, für Motivation und Inspiration und nicht zuletzt die Zeit, die Sie in den Jahren aufgewendet haben.

Herrn Prof. Dr. Harald Kolmar vom Fachbereich Chemie sowie Frau Prof. Dr. Felicitas Pfeifer vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt für die Übernahme des Referats bzw. Korreferats sowie die konstruktiven Diskussionen und Hilfestellungen.

Frau Dr. Sabrina Fröls vom Fachbereich Biologie der TU Darmstadt, ohne deren praktische und theoretische Einführung nicht ein einziges DNA-Molekül den Weg ins Reaktionsgefäß gefunden hätte, und ohne deren andauernde Bereitschaft zur Hilfestellung in Rat und Tat nicht ein Pinselstrich dieser Arbeit entstanden wäre, für ständige Motivation und Inspiration und für das freundschaftliche Verhältnis. Danke!

Herrn Prof. Dr. Franz-Josef Meyer-Almes vom Fachbereich Chemie und Biotechnologie der Hochschule Darmstadt für die kreativen Diskussionen.

Frau Dipl.-Ing. (FH) Ulrike Becher und Herrn Dipl.-Ing. (FH) Michael Schröder für die Organisation der Labore sowie die fachliche Unterstützung in Rat und Tat.

Herrn PD Dr. Arnulf Kletzin vom Fachbereich Biologie der TU Darmstadt für fachliche Diskussionen in Theorie und Praxis sowie die theoretische und praktische Hilfestellung in bioinformatischen Problemstellungen.

Allen Mitgliedern der AG Biochemie der Hochschule Darmstadt, von denen jede/-r Einzelne ihren/seinen ganz persönlichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hatte, und für das wunderbare Arbeitsklima.

Allen Mitgliedern der AG Pfeifer, hier namentlich ganz besonders Frau Dipl.-Biol. Stella Tavlaridou, und der AG Kletzin der TU Darmstadt für die fachliche Unterstützung sowie die konstruktiven Diskussionen und aufmunternden Worte.

Herrn Dr. Martin Hils und Herrn Dipl.-Ing. (FH) Johannes Weber von der Zedira GmbH Darmstadt für die fachliche Beratung sowie die praktische Hilfestellung.

Frau Wendy Kaman von Erasmus Medical Centre Rotterdam für die Charakterisierung der Proteine hinsichtlich antibiotischer Eigenschaften.

Herrn Prof. Dr. Dieter Stoll vom naturwissenschaftlichen und medizinischen Institut der Universität Tübingen für die Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen.

Herrn Dr. Andreas Christmann vom Fachbereich Chemie der TU Darmstadt für die Unterstützung in bioinformatischen Problemstellungen.

Herrn Dipl.-Biol. Leonhard Henkes für die fachliche und menschliche Unterstützung sowie die grafische Gestaltung dieser Arbeit.

Herrn Dipl.-Ing. (FH) Thomas Leiser für die Einführung ins Labor, die fachliche Unterstützung sowie den Rückhalt in schweren Zeiten.

Den B. Sc. Frau Marina und Vera Ehret, Frau Merle Hirschmann sowie Herrn Daniel Dehm, Herrn Christian Ehmann und Herrn David Fiebig für die außerordentliche Leistung im Labor, ohne die diese Arbeit einen anderen Verlauf genommen hätte.

Meinen Freunden, hier namentlich ganz besonders Herr Tobias Henn, Herr Matthias König und Herr Thomas Wilhelm, für den Rückhalt und die Unterstützung in schlechten sowie die Wertschätzung in guten Zeiten.

Allen Menschen, deren Wege sich im und um das Labor mit dem meinen kreuzten, die hier jedoch namentlich keine Erwähnung fanden, aber trotzdem einen großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit haben.

Mein ganz besonderer Dank gehört meiner Familie, ohne deren andauernde und bedingungslose Unterstützung, Hilfestellung und Rückhalt in allen Lebenslagen es niemals dazu gekommen wäre, dass ich diese Zeilen überhaupt schreiben dürfte. DANKE EINFACH FÜR ALLES!!!

7. Anhang

7.1. Zur Ableitung der Primer herangezogene Nutzungshäufigkeit der Codons bei *Streptomyces mobaraensis*

Tab. 57: Von *S. mobaraensis* bevorzugte Nukleotidtripletts

AS	Codon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Ø	AS	Codon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Ø
A	GCT	1.0	0.4	0.0	0.0	0.2	0.0	1.0	0.0	0.1	0.9	0.4	P	CCT	0.4	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.1
	GCC	5.2	5.4	7.5	7.0	5.4	6.6	4.9	5.6	5.5	7.6	6.1		CCC	5.2	1.9	8.3	4.7	4.4	5.3	2.8	3.6	3.0	3.7	4.3
	GCA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.5	0.0	0.1	0.3	0.1		CCA	0.0	0.0	0.0	0.6	0.7	0.3	0.6	0.0	0.0	0.0	0.2
	GCG	3.9	4.3	2.5	3.0	4.4	3.2	3.6	4.4	4.3	1.2	3.5		CCG	4.3	7.6	1.7	4.7	4.8	4.4	6.7	6.4	7.0	6.0	5.4
C	TGT	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	10.0	0.0	0.0	0.0	1.0	Q	CAA	0.0	0.0	2.0	1.7	0.0	1.3	2.5	0.0	0.9	0.0	0.8
	TGC	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	0.0	10.0	10.0	10.0	9.0		CAG	10.0	10.0	8.0	8.3	10.0	8.8	7.5	10.0	9.1	10.0	9.2
D	GAT	0.3	0.0	0.0	0.6	0.5	0.3	1.5	0.0	0.4	0.0	0.4	R	CGT	0.3	5.5	0.0	0.7	0.3	0.5	0.4	0.4	0.4	0.3	0.9
	GAC	9.7	10.0	10.0	9.4	9.5	9.7	8.5	10.0	9.6	10.0	9.6		CGC	3.4	3.5	5.7	4.3	3.5	4.4	3.5	7.5	4.2	7.1	4.7
E	GAA	1.9	0.0	3.1	4.2	0.6	1.2	3.2	0.0	0.7	1.1	1.6		CGA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.2	0.4	0.0	0.1	0.0	0.1
	GAG	8.1	10.0	6.9	5.8	9.4	8.8	6.8	10.0	9.3	8.9	8.4		CGG	3.8	1.0	4.3	4.6	5.9	4.7	5.7	2.1	4.6	2.4	3.9
F	TTT	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	S	AGA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.3	0.1
	TTC	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0		AGG	2.4	0.0	0.0	0.4	0.0	0.2	0.0	0.0	0.5	0.0	0.3
G	GGT	1.8	4.1	0.0	0.0	1.0	1.1	2.5	0.9	0.4	0.4	1.2	S	TCT	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	GGC	6.4	5.9	8.1	8.0	5.4	6.5	4.2	9.1	6.6	5.4	6.6		TCC	3.3	3.8	4.6	7.8	3.6	4.3	3.7	3.3	2.5	3.1	4.0
	GGA	0.7	0.0	0.4	0.0	0.6	0.9	0.4	0.0	0.2	0.0	0.3		TCA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0
	GGG	1.1	0.0	1.5	2.0	3.1	1.5	2.9	0.0	2.8	4.2	1.9		TCG	3.0	6.3	0.8	0.0	3.6	3.8	5.8	5.4	4.8	3.1	3.6
H	CAT	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4	0.5	0.0	1.0	0.8	0.0	0.4	S	AGT	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.4	0.1
	CAC	10.0	10.0	10.0	10.0	8.6	9.5	10.0	9.0	9.2	10.0	9.6		AGC	3.3	0.0	4.6	2.2	2.9	1.9	0.5	1.3	1.9	3.5	2.2

Tab. 57: Von *S. mobaraensis* bevorzugte Nukleotidtripletts (Fortsetzung)

I	ATT	2.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	2.0	0.0	0.0	0.7	0.5	T	ACT	0.7	0.6	0.0	0.0	0.0	0.3	1.5	0.0	0.2	0.0	0.3
	ATC	6.0	10.0	10.0	10.0	9.4	10.0	8.0	10.0	9.1	8.6	9.1		ACC	4.7	7.5	9.3	5.6	5.7	7.8	5.4	7.1	6.0	5.2	6.4
	ATA	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	0.7	0.4		ACA	0.7	0.0	0.0	0.0	0.7	0.3	0.8	0.0	0.0	0.0	0.2
K	AAA	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.0	0.1	V	ACG	4.0	1.9	0.7	4.4	3.7	1.8	2.3	2.9	3.8	4.8	3.0
	AAG	9.5	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	9.3	10.0	9.9		GTT	0.0	0.3	0.0	0.5	0.0	0.0	0.3	0.0	0.2	0.0	0.1
L	CTT	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1	W	GTC	6.7	7.9	6.8	5.8	4.9	6.0	2.8	8.6	5.3	5.6	6.0
	CTC	2.3	4.6	3.8	5.4	3.3	4.6	2.5	4.3	2.6	4.1	3.7		GTA	0.6	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.3	0.0	0.5	0.0	0.2
	CTA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		GTG	2.8	1.8	3.2	3.2	5.1	4.0	6.7	1.4	4.1	4.4	3.6
	CTG	7.7	5.0	6.2	4.6	6.8	5.4	5.4	5.7	6.7	5.5	5.9	Y	TGG	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
	TTA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		TAT	0.6	0.0	0.0	1.7	1.3	0.0	3.3	0.8	0.5	0.0	0.8
	TTG	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.1	0.0	0.6	0.3	0.3		TAC	9.4	10.0	10.0	8.3	8.8	10.0	6.7	9.2	9.5	10.0	9.2
M	ATG	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	St	TAA	0.0	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0
N	AAT	3.0	0.0	0.0	1.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.5	0.6		TAG	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	10.0	1.0
	AAC	7.0	10.0	10.0	8.3	10.0	10.0	10.0	10.0	9.4	9.5	9.4		TGA	10.0	0.0	0.0	0.0	10.0	10.0	0.0	0.0	10.0	0.0	4.0

Aufgeführt ist die Häufigkeit der verwendeten Codons von zehn sequenzierten *S. mobaraensis*-Genen mit bekannter Proteinsequenz. Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode angegeben, die Nutzungshäufigkeit eines Codons ist angegeben in Promille. Die Gendaten wurden aus der ExPASy-Datenbank bezogen (Stand: August 2010). 1 = Transglutaminase (GenBank: AY241675.1); 2 = Elongationsfaktor G (GenBank: AF153617.1); 3 = Nicht-ribosomale Peptidsynthetase (GenBank: AB432492.1); 4 = Epoxidase (GenBank: GU339429.1); 5 = Aminoacylase (GenBank: AB473622.1); 6 = Epsilon-Lysinacetylase (GenBank: AB473622.1); 7 = Polyketidsynthetase (GenBank: AB431384.1); 8 = Gyrase B (GenBank: AB072866.1); 9 = Penicillin-V-Acylase (GenBank: AB262553.1); 10 = Tripeptidylaminopeptidase (GenBank: AB159671.1)

7.2. Erklärungen

Stephan Zindel
Osteinstraße 7 - 9
55118 Mainz

Mainz, 02.04.2013

Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich meine Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

(Stephan Zindel)

Stephan Zindel
Osteinstraße 7 - 9
55118 Mainz

Mainz, 02.04.2013

Erklärung

Ich erkläre, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.

(Stephan Zindel)

7.2. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Stephan Zindel
Geburtstag: 31.05.1982
Geburtsort: Mainz

Schulische Ausbildung

1988 - 1992 Heinrich Mumbächer-Grundschule Mainz
1992 - 2001 Gutenberg-Gymnasium Mainz
2001 Abitur

Akademische Ausbildung

2001 - 2008 Studium der Chemie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

2008 Diplomarbeit zum Thema „Untersuchungen von Acetaldehydaddukten des Serumproteins Albumin“ unter PD Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Stefan W. Tönnes (Zentrum für Rechtsmedizin, Abteilung für Forensische Toxikologie) an der Goethe Universität Frankfurt/Main (Referent: Prof. Dr. Thorsten Hoffmann, Fachbereich Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz)

2008 Abschluss des Studiums der Chemie an der Johannes Gutenberg-Universität als Diplom-Chemiker

2009 - 2013 Promotion an der Hochschule Darmstadt in Kooperation mit der Technischen Universität Darmstadt bei Herrn Prof. Dr. Hans-Lothar Fuchsbauer (H_Da) und Herrn Prof. Dr. Harald Kolmar (TUD)

Titel: „Struktur und Funktion enzymatisch vernetzbarer Proteaseinhibitoren von *Streptomyces mobaraensis*“

(Stephan Zindel)